

10/536802
PCT/IP03/14854
01.3.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年11月29日
Date of Application:

出願番号 特願2002-349015
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2002-349015]

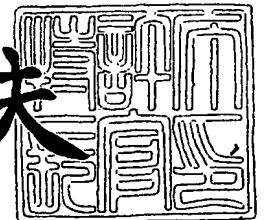
出願人 独立行政法人 科学技術振興機構
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月18日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-309623C

【書類名】 特許願
【整理番号】 A211P06
【提出日】 平成14年11月29日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 38/17 ABA
A61K 38/17 ADU
A61K 48/00
C07K 14/435
C12N 15/12

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県生駒市北大和2丁目20-7

【氏名】 松本 美佐子

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県奈良市鶴舞西町2-10-E106

【氏名】 瀬谷 司

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市生野区生野西4-3-17

【氏名】 押海 裕之

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100080034

【弁理士】

【氏名又は名称】 原 謙三

【電話番号】 06-6351-4384

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003229

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0111475

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 哺乳動物の T o l l 様受容体 3 に結合する新規アダプタータンパク質およびその遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 2】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列のうち 3 9 4 ～ 5 3 2 番目のアミノ酸配列を有するタンパク質。

【請求項 3】

配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列のうち 3 9 6 ～ 5 3 4 番目のアミノ酸配列を有するタンパク質。

【請求項 4】

配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列において、1 またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、哺乳動物の T o l l 様受容体 3 に対して特異的に結合する性質と、I 型インターフェロンの産生を誘導する性質とを併せ持つタンパク質。

【請求項 5】

配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列において、1 またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、哺乳動物の I 型インターフェロンの産生を誘導する性質を持つ一方、哺乳動物の T o l l 様受容体 3 に対して特異的に結合する性質に異常を持つタンパク質。

【請求項 6】

配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列において、1 またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ

、哺乳動物の T o l l 様受容体 3 に対して特異的に結合する性質を持つ一方、哺乳動物の I 型インターフェロンの産生を誘導する性質に異常を持つタンパク質。

【請求項 7】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、少なくとも 434 番目のアミノ酸が置換又は欠失され、かつ、394～532 番目のアミノ酸配列の少なくとも一部を保持している請求項 6 記載のタンパク質。

【請求項 8】

請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 9】

cDNA であって、配列番号 1 に示される塩基配列のうち、63～2198 番目の塩基配列をオープンリーディングフレームとして有する請求項 8 記載の遺伝子。

【請求項 10】

cDNA であって、配列番号 3 に示される塩基配列のうち、66～2261 番目の塩基配列をオープンリーディングフレームとして有する請求項 8 記載の遺伝子。

【請求項 11】

請求項 8 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含む組換え発現ベクター。

【請求項 12】

請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質に対して特異的に結合する抗体。

【請求項 13】

請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を有効成分として含むウイルス感染症の予防・治療剤。

【請求項 14】

請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を有効成分として含む腫瘍の治療剤。

【請求項 15】

請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質をコードする遺伝子を含む組換え発現ベクターを有効成分として含むウイルス感染症の予防・治療剤。

【請求項 16】

請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質をコードする遺伝子を含む組換え発現ベクターを有効成分として含む腫瘍の治療剤。

【請求項 17】

請求項 6 または 7 に記載のタンパク質を有効成分として含む自己免疫疾患の治療剤。

【請求項 18】

請求項 6 または 7 に記載のタンパク質を有効成分として含むアトピー性疾患の治療剤。

【請求項 19】

請求項 6 または 7 に記載のタンパク質をコードする遺伝子を含む組換え発現ベクターを有効成分として含む自己免疫疾患の治療剤。

【請求項 20】

請求項 6 または 7 に記載のタンパク質をコードする遺伝子を含む組換え発現ベクターを有効成分として含むアトピー性疾患の治療剤。

【請求項 21】

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質に対して特異的に結合する抗体を有効成分として含む自己免疫疾患の治療剤。

【請求項 22】

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のタンパク質に対して特異的に結合する抗体を有効成分として含むアトピー性疾患の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、哺乳動物の T o l l 様受容体 3 に結合して I 型インターフェロンの産生を誘導しうる性質を持つ新規アダプタータンパク質およびその変異体、並びにそれをコードする遺伝子、その用途に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

インターフェロンは、ウイルスに対する適応免疫応答において重要な役割を果たすタンパク質である。

【0003】

前述したように、インターフェロンは、適応免疫系において重要な役割を果たしており、適応免疫系におけるインターフェロンの役割については詳細な研究がなされている。しかしながら、病原体に対する免疫応答の際に、生体内でインターフェロンがどのようなシグナル伝達経路を介して産生されるかについてはほとんど解明されていなかった。

【0004】

最近、哺乳動物の自然免疫系において病原体を認識する受容体としてToll様受容体 (Toll-like Receptor; 以下、適宜「TLR」と略記する) が発見され、このTLRに関する研究により、自然免疫系における病原体の認識に係わるシグナル伝達経路が明らかにされつつある。

【0005】

哺乳動物のTLRファミリーは、ショウジョウバエとヒトとの種の違いを越えて保存されていると考えられる主要な組織であり、様々な微生物構成成分を認識し、核因子 κ B (以下、「NF- κ B」と略記する) の活性化および他のシグナル伝達経路を媒介する。

【0006】

現在、ヒトでは、TLRファミリーに属する10種の受容体 (ヒトTLR1～10) が確認されており、これらのマウス相同体 (マウスTLR1～10) も確認されている。TLRファミリータンパク質は、複数のロイシン・リッチ・リピート (LRR) およびそれとカルボキシル末端 (C末端) 隣接領域を含む細胞外領域と、Toll/インターロイキン1受容体相同ドメイン (TIR) と呼ばれる細胞質の (細胞内の) シグナル伝達領域とから構成されている。各TLRは、特有の1種または複数種のリガンドを細胞外領域で認識し、細胞内のTIRを媒介すると推測される免疫応答を誘発する。各TLRによって誘発される免疫応答

は、互いに異なっており、一部が重複していることもある。

【0007】

ほとんどのTLRファミリーのタンパク質に共通する細胞質領域のTIRドメインは、シグナル伝達およびアダプター分子MyD88またはMal/TIRAPの相互作用を引き起こすと考えられている。すなわち、TLR2、TLR4、TLR5、TLR7、およびTLR9は、アゴニスト刺激の下でアダプター分子MyD88によってシグナルを伝達してNF- κ Bを活性化する。

【0008】

一方、最近、TLR4を介するシグナル伝達経路においては、TLR4と会合するアダプター分子Mal/TIRAP (MyD88-adap-ter-likeあるいはTIRAPと呼ばれているアダプター分子) が関与していることが報告されている (非特許文献2～4参照)。

【0009】

上記の報告によれば、TLR4は、NF- κ B、MAPK、およびインターフェロン β プロモータの活性化に関与している。このインターフェロン β プロモータの活性化を誘導するTLR4の特有の能力は、「アダプター分子MyD88に非依存的なシグナル伝達経路」と呼ばれている、TLR4と会合するアダプター分子Mal/TIRAPによって媒介されるシグナル伝達経路に起因している。すなわち、TLR4を介するシグナル伝達では、アダプター分子MyD88と異なる第2のアダプター分子Mal/TIRAPとTLR4との協働によって、NF- κ BおよびI型インターフェロンプロモータの活性化が制御される。マクロファージ (Mf) においては、TLR2刺激ではなくTLR4刺激の結果として、インターフェロン β のプロモータ活性化がSTAT1による α/β リン酸化を誘導する。その後、インターフェロン β をコードしている遺伝子の発現は、MCP (Monocyte Chemoattractant Protein)-5、IP (インターフェロン誘導タンパク質)-10、およびiNOS (誘導型NO合成酵素) の産生を誘導する。これは、再びアダプター分子MyD88に非依存的な経路を介して起こり、MyD88-/-細胞 (アダプター分子MyD88を欠損させた細胞) でさえ起こる。

【0010】

現在まで最も可能性が高いと思われていた概念は、アダプター分子M a l / T I R A P がアダプター分子M y D 8 8 に非依存的な経路をカバーするということである。

【0011】

これに対して、本願発明者等は、二本鎖RNAによって誘導されヒトTLR3を介した免疫応答を研究し、ヒトの線維芽細胞において、ヒトTLR3が、細胞表面上での二本鎖RNAの認識に関与し、インターフェロン β 産生を誘導する下流のシグナル伝達を引き起こすことを見出した（非特許文献1参照）。すなわち、インターフェロン β プロモータの活性化およびインターフェロン β の産生が、二本鎖RNAに応答したヒトTLR3によって強くかつ急速に誘導されることを示した（非特許文献1参照）。ヒトTLR3は、二本鎖RNAの類似体であるポリ（I:C）にも応答してNF- κ Bおよびインターフェロン β プロモーターを活性化させる（非特許文献1参照）。リポーター遺伝子分析により、ヒトTLR3は、インターフェロン β プロモータの活性化を媒介するが、NF- κ Bの活性化はそれより低いレベルでしか媒介しないことが明らかになった（非特許文献1参照）。この結果は、他のTLR、TLR2、TLR5、TLR7、およびTLR9が、それらに特有のリガンドを認識したのに続いて、アダプター分子M y D 8 8 を介してNF- κ Bおよびp38 MAPK（MAPキナーゼ）を活性化したのと著しく異なっている。

【0012】

ところで、TLR3によって誘導されるI型インターフェロン（インターフェロン α およびインターフェロン β ）は、抗ウイルス作用や抗がん作用を示すことが知られている。詳細には、I型インターフェロンは、以下のような作用を持つことが知られている。

【0013】

I型インターフェロンは、以下のような複数の作用機序により抗ウイルス作用を奏することが知られている。

【0014】

①ウイルスのmRNAを不安定化し、宿主のタンパク翻訳を抑制する細胞内遺伝子を活性化する。これにより、ウイルスの複製を抑制し、ウイルスの増殖を抑制する。

【0015】

②MHCクラスI分子の発現を誘導し、ナチュラルキラー（NK）細胞に対する抵抗性を誘導する。細胞障害性CD8⁺T細胞に対する感受性を亢進させる。さらに、T細胞の活性化の抑制およびT細胞サプレッサー活性の増強にも関与する。

【0016】

③ウイルス感染細胞を選択的に障害するナチュラルキラー（NK）細胞を活性化し、ナチュラルキラー（NK）細胞によるアポトーシスをウイルスに誘導する。

【0017】

また、I型インターフェロンは、以下のような複数の作用機序により抗腫瘍作用を奏することが知られている。

【0018】

1) 腫瘍細胞内のmRNAを不安定化し、宿主のタンパク翻訳を抑制する細胞内遺伝子を活性化する。これにより、腫瘍細胞内のタンパク質の合成を抑制し、腫瘍細胞の増殖を抑制する。

【0019】

2) マクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞等の抗腫瘍エフェクターを活性化し、これらの抗腫瘍エフェクターにより腫瘍細胞を障害することで、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導する。

【0020】

3) ウイルス感染細胞を選択的に障害するナチュラルキラー（NK）細胞を活性化し、ナチュラルキラー（NK）細胞によるアポトーシスを腫瘍細胞に誘導する。

【0021】

さらに、I型インターフェロンは、前述したようにT細胞の活性化の抑制、T

細胞サプレッサー活性の増強にも関与することから、ある種の自己免疫疾患を改善できると考えられる。

【0022】

I型インターフェロンは、以上のような抗ウイルス作用および抗腫瘍作用を持つことから、従来より、インターフェロン α 製剤やインターフェロン β 製剤が、B型肝炎、C型肝炎、C型肝炎から誘発される肝がん、腎臓がん等の治療剤として使用されている。例えば、天然型インターフェロン α 製剤である住友製薬株式会社製の「スミフェロン（登録商標）」などが、臨床応用において好成績を挙げている。

【0023】

【非特許文献1】

Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K., & Seya, T. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. Biochem. Biophys. Res. Commun. 293: 1364-1369 (2002年5月31日電子発行)

【0024】

【非特許文献2】

Kawai, T., et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. J. Immunol. 167: 5887-5894 (2001)

【0025】

【非特許文献3】

Horng, T., Barton, G. M., & Medzhitov, R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. Nat. Immunol. 2: 835-841 (2001)

【0026】

【非特許文献4】

Fitzgerald, K. A., et al. Mal (MyD88-adapter-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. Nature 413: 78-83 (2001)

【0027】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、これまでのTLRに関する研究では、二本鎖RNAを認識したTLR3によりI型インターフェロンの産生が誘導されるシグナル伝達経路が、他のTLRを介したシグナル伝達経路とは異なることが示唆されているものの、このシグナル伝達経路に関与するタンパク質は解明されていない。

【0028】

もしTLR3と特異的に結合して下流のI型インターフェロンの産生に至るシグナル伝達を誘導するタンパク質の存在が明らかにされれば、ウイルスに対する自然免疫応答における重要なシグナル伝達経路およびその調節機構の解明が進むこととなり、自然免疫系に係わる種々の病気の病態解析や、自然免疫応答の調節による治療薬の開発等に有効利用できると考えられる。

【0029】

また、前述したウイルス感染症や腫瘍の治療に用いられているインターフェロン製剤は、全身投与なので、治療効果の得られる濃度では、精神・神経症状（うつ病等）、自己免疫疾患（甲状腺機能異常、自己免疫性肝炎、溶血性貧血、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ等）が悪化する等の副作用が強い。インターフェロン製剤による副作用は、本来はインターフェロンを産生しない正常な宿主細胞にまでインターフェロンが導入されてしまうために、本来は外部抗原に対する免疫応答時に行われるべきT細胞に対する自己抗原の提示が、インターフェロンの導入部位全体で誘導され、自己免疫現象が起こり易くなるためであると考えられる。

【0030】

このように、インターフェロン製剤は、治療効果の得られる濃度では副作用が強いので、全身投与では十分な抗がん作用を維持するのが難しい。また、インターフェロン製剤を局所投与したとしても、副作用を完全に避けることは難しいと考えられる。

【0031】

もしTLR3と特異的に結合して下流のI型インターフェロンの産生に至るシ

グナル伝達を誘導する新規なタンパク質を見出せば、生体内で局所的なI型インターフェロンの産生を亢進することによりウイルス感染症や腫瘍等を治療する新たな治療剤を開発することができると考えられる。また、この新規なタンパク質の機能解析を通じて生体内でI型インターフェロンの産生を阻害するタンパク質を提供し、このタンパク質により生体内でI型インターフェロンの産生を阻害することにより自己免疫疾患やアレルギー性疾患等を治療する新たな治療剤を提供することができると考えられる。

【0032】

本発明は、上記の課題に鑑みなされたものであり、その目的は、哺乳動物のT_H1様受容体3に特異的に結合する性質を持つ新規アダプタータンパク質およびその変異体、上記タンパク質の遺伝子、上記遺伝子を含む組換え発現ベクター、上記タンパク質に対する抗体、並びにこれらを用いたウイルス感染症の予防・治療剤、腫瘍の治療剤、自己免疫疾患の治療剤、およびアレルギー性疾患の治療剤を提供することにある。

【0033】

【課題を解決するための手段】

本願発明者等は、最近、ヒトTLR3が、現在知られているTLRファミリー全般のシグナル伝達に必須と考えられているアダプター分子MyD88、およびTLR4に会合するアダプター分子Mal/TIRAPに依存することなく、二本鎖RNA（リボ核酸）の存在を示すシグナルを伝達してインターフェロン（IFN） β の産生を誘導することを見出した。

【0034】

本願発明者は、哺乳動物のT_H1様受容体3に特異的に結合する性質を持つ新規なアダプタータンパク質について鋭意検討した結果、哺乳動物のT_H1様受容体3に特異的に結合する性質を持つ新規アダプタータンパク質を同定するとともに、その全長遺伝子配列を決定し、さらに、この新規タンパク質が、核因子を活性化しインターフェロン β の産生を誘導する機能を持つことを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0035】

本発明に係るタンパク質は、配列番号2または4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその変異体である。

【0036】

上記タンパク質は、後述するように、本願発明者等が初めて同定し、その全長アミノ酸配列を明らかにした新規のアダプタータンパク質（本願発明者等はこれを「TICAM-1」と命名した；以下、適宜「アダプタータンパク質TICAM-1」と記す）であり、配列番号2にはヒト由来のアミノ酸配列を、配列番号4にはマウス由来のアミノ酸配列をそれぞれ示す。このアダプタータンパク質TICAM-1は、後述するように、他のTLRやTLR3変異体等とは結合せずTLR3と特異的に結合し、哺乳動物の核因子 κ B（NF- κ B）およびインターフェロン β プロモータを活性化し、インターフェロン β の産生を誘導する機能を持つことが確認された。

【0037】

したがって、上記タンパク質は、哺乳動物のI型インターフェロンの産生を亢進することができる。それゆえ、前述したI型インターフェロンの抗ウイルス作用や抗腫瘍作用を利用して、B型肝炎やC型肝炎等のウイルス感染症等の予防・治療（予防または治療）、腫瘍（がん）の自然免疫治療等が可能となる。

【0038】

すなわち、ウイルス感染症の殆どでウイルスの二本鎖RNAが関与することが証明されており、この二本鎖RNAは、TLR3によって認識され、TICAM-1を介したシグナル伝達経路によりI型インターフェロンの産生を誘導する。したがって、ウイルス感染症に対してアダプタータンパク質TICAM-1を投与すれば、ウイルス感染症に対する自然免疫系の免疫応答を増強し、ウイルス感染部位において選択的にI型インターフェロンを大量に産生させることができる。それゆえ、ウイルス非感染部位に対するI型インターフェロンの導入によって引き起こされる自己免疫疾患等の副作用を回避しながら、I型インターフェロンの抗ウイルス作用によりウイルス感染症を予防または治療することができる。

【0039】

また、アダプタータンパク質TICAM-1は、後述するように、TLR3と

会合しなくとも、単独で I 型インターフェロンの産生を誘導することが確認された。したがって、アダプタータンパク質 T I C A M-1 は、ウイルス感染時以外にも I 型インターフェロンの産生を誘導でき、I 型インターフェロンの産生により改善される各種の疾患に有効である。例えば、腫瘍に対してアダプタータンパク質 T I C A M-1 を投与すれば、I 型インターフェロンの産生を誘導することができるので、I 型インターフェロンの抗腫瘍作用を利用して腫瘍の治療が可能となる。

【0040】

また、上記タンパク質は、アダプター分子 M y D 8 8 および M a l / T I R A P に非依存的な T L R 3 を介する新たなシグナル伝達経路が存在することを明らかにするものであり、この新たなシグナル伝達経路により、T L R ファミリーからインターフェロン β プロモーターの活性化に至るシグナル伝達のミッシングリンクが説明可能となる。そのため、タンパク質は、上記 T L R 3 を介したシグナル伝達系ならびにその調節機構を研究解析するための研究材料として有用であるばかりでなく、こうした研究を通じて、当該シグナル伝達系やその調節機構に関わる種々の病気の病態解析に有効利用できる可能性がある。

【0041】

なお、上記タンパク質が、インターフェロン α の産生を誘導する機能を持つかは検証されていないが、これまでの研究によりインターフェロン α およびインターフェロン β の産生に係るシグナル伝達経路が共通していることが確認されていることから、上記タンパク質は、インターフェロン α の産生を誘導する機能も持っていると推定される。

【0042】

ここで、上記「タンパク質」は、細胞、組織などから単離精製された状態であってもよいし、タンパク質をコードする遺伝子を宿主細胞に導入して、そのタンパク質を細胞内発現させた状態であってもよい。また、本発明に係るタンパク質は、付加的なポリペプチドを含むものであってもよい。このようなポリペプチドが付加される場合としては、例えば、H A や F l a g 等によって本発明のタンパク質がエピトープ標識されるような場合が挙げられる。

【0043】

本発明に係る配列番号2または4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の変異体は、配列番号2または4に示されるアミノ酸配列において、1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるものであって、(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列のうち394～532番目のアミノ酸配列(TIRドメイン)を有するもの、(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列のうち396～534番目のアミノ酸配列(TIRドメイン)を有するもの、(c) 哺乳動物のToll様受容体3に対して特異的に結合する性質と、哺乳動物のI型インターフェロンの産生を誘導する性質とを併せ持つもの、(d) 哺乳動物のI型インターフェロンの産生を誘導する性質を持つ一方、哺乳動物のToll様受容体3に対して特異的に結合する性質に異常(低下あるいは欠失)を持つもの、または(e) 哺乳動物のToll様受容体3に対して特異的に結合する性質を持つ一方、哺乳動物のI型インターフェロンの産生を誘導する性質に異常を持つものである。上記(e)のタンパク質の具体例としては、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、少なくとも434番目のアミノ酸が置換又は欠失され、かつ、394～532番目のアミノ酸配列(TIRドメイン)の少なくとも一部を保持しているヒト由来のタンパク質が挙げられる。

【0044】

上記タンパク質の変異体は、上記TLR3を介したシグナル伝達系ならびにその調節機構を研究解析するための研究材料として有用であるばかりでなく、こうした研究を通じて、当該シグナル伝達系やその調節機構に関わる種々の病気の病態解析に有効利用できる可能性がある。

【0045】

さらに、上記(a)～(c)の変異タンパク質は、上記配列番号2または4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と同様に、哺乳動物のI型インターフェロンの産生を亢進することができる。それゆえ、前述したI型インターフェロンの抗ウイルス作用や抗腫瘍作用を利用して、B型肝炎やC型肝炎等のウイルス感染症等の予防・治療(予防または治療)、腫瘍(がん)の自然免疫治療等が可能となる。

【0046】

上記(d)の変異タンパク質は、哺乳動物のI型インターフェロンの産生を亢進することができるので、I型インターフェロンの産生を亢進することによって改善される疾患（がんやウイルス感染症等）の予防または治療のための治療剤として使用することができる。

【0047】

上記(e)の変異タンパク質は、TLR3に結合してTLR3からI型インターフェロンの産生に至るシグナル伝達を阻害するので、哺乳動物のI型インターフェロンの産生を抑制することができる。それゆえ、それゆえ、I型インターフェロンの産生によって引き起こされる自己免疫疾患やアレルギー性疾患等の疾患の予防または治療に使用できると考えられる。

【0048】

また、上記(a)～(e)の変異タンパク質は、例えば、野生型タンパク質と構造を比較することにより、その構造の中で活性に必須な領域が明らかになるという、タンパク質の機能解析においても有用である。

【0049】

なお、上記「1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異タンパク質作製法により置換、欠失、挿入、及び／又は付加できる程度の数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されることを意義する。換言すれば、配列番号2または4に示されるアミノ酸配列の1またはそれ以上のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるものとは、配列番号2または4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質を変異した変異体（変異タンパク質）である。ここにいう「変異」は、主として公知の変異タンパク質作製法により人為的に導入された変異を意味するが、天然に存在する同様の変異タンパク質を単離精製したものであってもよい。

【0050】

本発明に係る遺伝子は、上記タンパク質のいずれかをコードする遺伝子である。

【0051】

上記遺伝子は、上記TLR3を介したシグナル伝達系ならびにその調節機構を研究解析するための研究材料として有用であるばかりでなく、こうした研究を通じて、当該シグナル伝達系やその調節機構に関わる種々の病気の病態解析に有効利用できる可能性がある。

【0052】

なお、上記「遺伝子」とは、少なくともゲノムDNA、cDNA、mRNAを含む意味であり、本発明に係る遺伝子としては、①配列番号1に示される塩基配列のうち、63～2198番目の塩基配列をオープンリーディングフレームとして有するヒト由来のcDNA、②配列番号3に示される塩基配列のうち、66～2261番目の塩基配列をオープンリーディングフレームとして有するマウス由来のcDNA、③これらcDNAの塩基配列に対応する塩基配列を有するmRNAが例として挙げられる。

【0053】

また、上記「遺伝子」とは、2本鎖DNAのみならず、それを構成するセンス鎖およびアンチセンス鎖といった各1本鎖DNAやRNAを包含する。さらに、上記「遺伝子」は、オープンリーディングフレーム以外に、非翻訳領域(UTR)の配列やベクター配列(発現ベクター配列を含む)などの配列を含むものであってもよい。例えば、タンパク質をコードする配列をベクター配列につないで本発明の遺伝子を構成し、これを適当な宿主で増幅させることにより、本発明の遺伝子を所望に増幅させることができる。また、本発明の遺伝子の一部配列をプローブに用いてもよい。このようにプローブに用いる場合としては、例えば、本発明の遺伝子の一部配列をチップ上に固定してDNAチップを構成し、当該DNAチップを各種検査・診断用に用いるような場合が挙げられる。

【0054】

本発明に係る組換え発現ベクターは、上記遺伝子を含むものである。

【0055】

この組換え発現ベクターを用いると、公知の遺伝子工学的手法(遺伝子操作技術)により標的細胞を形質転換して標的細胞に上記遺伝子を導入することができ

る。

【0056】

上記形質転換により得られる形質転換体は、上記TLR3を介したシグナル伝達系ならびにその調節機構を研究解析するための研究材料として有用であるばかりでなく、こうした研究を通じて、当該シグナル伝達系やその調節機構に関わる種々の病気の病態解析に有効利用できる可能性がある。

【0057】

また、上記形質転換によって、この組換え発現ベクターに含まれる遺伝子を哺乳動物の標的細胞（宿主細胞）内に導入し、その細胞内で発現させることで、哺乳動物のI型インターフェロンの産生を制御することができる。それゆえ、上記組換え発現ベクターは、I型インターフェロンの産生を亢進することによって改善される疾患（ウイルス感染症や腫瘍等）、あるいはI型インターフェロンの産生によって引き起こされる疾患の遺伝子治療が可能となる。

【0058】

本発明に係る抗体は、上記タンパク質に特異的に結合する抗体である。

【0059】

上記抗体は、宿主細胞におけるアダプタータンパク質TICAM-1の発現の検出、アダプタータンパク質TICAM-1の製造・精製等に有用であると考えられる。

【0060】

また、上記抗体は、哺乳動物のToll様受容体3に対して特異的に結合する性質を持つタンパク質に対して特異的に結合する抗体は、哺乳動物のToll様受容体3を介した免疫応答によるI型インターフェロンの産生を阻害することができる。I型インターフェロンの産生を亢進することによって改善される疾患（ウイルス感染症や腫瘍等）の予防・治療剤として有効である。

【0061】

【発明の実施の形態】

(1) 本発明に係るアダプタータンパク質TICAM-1、及びその遺伝子の配列、構造等

本願発明者等は、〔実施例〕で述べるHEK293細胞のトランスフェクトの実験によって、二本鎖RNAによって誘導されるヒトTLR3を介したTLR3シグナル伝達は、その細胞質の末端であるTIRドメインを通して行われ、主としてアダプター分子MyD88およびMal/TIRAPに非依存的事であることを見出した。

【0062】

そこで、本願発明者等は、少なくともTLR3を介するI型インターフェロンプロモーターの活性化には別のアダプター分子が優先的に関与していると考えた。

【0063】

本願発明者等は、I型インターフェロンの産生を誘導するシグナル伝達を優先的に媒介する、既知のアダプター分子MyD88およびMal/TIRAPとは異なる別のアダプター分子が存在するはずと考え、この未知のアダプター分子の同定を試みた。

【0064】

その結果、本願発明者等は、物理的にはヒトTLR3のToll/インターロイキン1受容体相同ドメイン（以下、「TIRドメイン」と略記する）と結合し、機能的にはポリイノシン酸-シチジル酸（以下、「ポリ（I:C）」と略記する）に応答してI型インターフェロンプロモーターの活性化を誘導する代替のアダプター分子を同定することに成功した。このアダプター分子は、TIRドメインを含有することから、本願発明者等は、「TIRドメイン含有アダプター分子」（以下、「TICAM-1」と略記する）と命名した。

【0065】

本発明に係るアダプタータンパク質TICAM-1のアミノ酸配列を、配列番号2および4に示す。配列番号2にはヒト由来のアダプタータンパク質TICAM-1（以下、「ヒトTICAM-1」と略記する）のアミノ酸配列を、配列番号4にはマウス由来のアダプタータンパク質TICAM-1（以下、「マウスTICAM-1」と略記する）をそれぞれ示す。

【0066】

また、上記アダプタータンパク質 T I C A M-1 をコードする完全長 c D N A 配列の塩基配列を、配列番号 1 および 3 に示す。配列番号 1 にはヒト T I C A M-1 をコードする c D N A の塩基配列を、配列番号 3 にはマウス T I C A M-1 をコードする c D N A の塩基配列をそれぞれ示す。

【0067】

なお、配列番号 1 の塩基配列中、63～2198 番目の塩基配列が、ヒト T I C A M-1 をコードするオープンリーディングフレーム (O R F) 領域に相当する。また、配列番号 3 の塩基配列中、66～2261 番目の塩基配列が、上記マウス T I C A M-1 をコードするオープンリーディングフレーム (O R F) 領域に相当する。配列番号 1 および 3 に示される各 c D N A 配列は、この O R F 領域のほか 5' 側及び 3' 側にそれぞれ非翻訳領域 (U T R) を含むものであった。

【0068】

ヒト T I C A M-1 は、N 末端のプロリン・リッチ・ドメイン (1～393 番目のアミノ酸配列)、T I R ドメイン (394～532 番目のアミノ酸配列)、および C 末端のプロリン・リッチ・ドメイン (533～712 番目のアミノ酸配列) から構成されていることが判明した (図 5)。

【0069】

ヒト T I C A M-1 の c D N A 配列の T I R ドメインは、既知のアダプター分子、ヒト M a l / T I R A P (非特許文献 3・4 参照) および ヒト M y D 8 8 の T I R ドメイン (図 6 の「M a l (T I R) . h u」および「M y D 8 8 (T I R) . h u」) に対する類似性が低く、他の T I R ドメイン含有タンパク質の T I R ドメイン中における保存配列である、B o x 1 の (F/Y) D、B o x 2 の R D、および B o x 3 の F W (Xu, Y, et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains, Nature 408: 111-115 (2000) 参照) が全て欠失している点で特異的である (図 6)。

【0070】

対照的に、ヒト T I C A M-1 では、T I R-M y D 8 8 を介するシグナル伝達に必須であり、既知のアダプター分子 M y D 8 8 および M a l / T I R A P で保存されている、いわゆる B B ループ (Xu, Y, et al. Structural basis for s

signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains, Nature 408: 111-115 (2000)参照) 内のプロリンが良く保存されていた。

【0071】

このヒトTICAM-1と既知のアダプター分子MyD88およびMal/TIRAPとの間のもう1つの重要な相違点は、ヒトTICAM-1は、Death領域(細胞死誘導領域)、あるいはより短いMalに類似したN末端ドメインが欠失しており、その代わりに、プロリン・リッチな長いN末端領域およびC末端領域を含んでいる点である。

【0072】

また、上記ヒトTICAM-1のcDNA配列を用いて、ヒトゲノムドラフトシーケンスのデータベース検索を行った。その結果、ヒトTICAM-1をコードするcDNA配列は、染色体19p13.3(遺伝子座)上に存在することが判明した。

【0073】

なお、上記タンパク質や遺伝子は、診断にも利用できる可能性がある。すなわち、診断対象の個体から採取した細胞においてアダプタータンパク質TICAM-1または同様の機能を持つ変異体の発現の有無を検出すれば、この結果に基づいて個体がアダプタータンパク質TICAM-1の欠損や変異に起因する免疫不全症にかかっているか否かを診断することができると考えられる。アダプタータンパク質TICAM-1または同様の機能を持つ変異体の発現の有無を検出する方法としては、DNAチップを用いてアダプタータンパク質TICAM-1の遺伝子を検出する方法、個体のアダプタータンパク質の遺伝子における一塩基多型(SNPs)を調べる方法等が考えられる。

【0074】

(2) 本発明に係るタンパク質、遺伝子の取得方法

本発明に係るタンパク質および遺伝子の取得方法について説明する。

【0075】

上記アダプタータンパク質TICAM-1をコードする遺伝子を取得する方法は、特に限定されるものではなく、前述の開示された配列情報等に基づいて種々

の方法により、上記遺伝子配列を含むDNA断片を単離し、クローニングすることができる。例えば、上記アダプタータンパク質T I C A M-1をコードするcDNAの一部配列と特異的にハイブリダイズするプローブを調製し、ヒトまたはマウスのゲノムDNAライブラリーやcDNAライブラリーをスクリーニングすればよい。このようなプローブとしては、上記アダプタータンパク質T I C A M-1をコードするcDNAの塩基配列又はその相補配列の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするプローブであれば、いずれの配列・長さのものを用いてもよい。また、上記スクリーニングにおける各ステップについては、通常用いられる条件の下で行えばよい。

【0076】

上記スクリーニングによって得られたクローンは、制限酵素地図の作成及びその塩基配列決定（シーケンシング）によって、さらに詳しく解析することができる。これらの解析によって、本発明に係る遺伝子配列を含むDNA断片を取得したか容易に確認することができる。

【0077】

また、上記プローブの配列を、上記アダプタータンパク質T I C A M-1の機能上重要と考えられるT I Rドメインの中から選択し、ヒト・マウスやその他の哺乳動物のcDNAライブラリーをスクリーニングすれば、上記アダプタータンパク質T I C A M-1と同様の機能を有する相同分子や類縁分子をコードする遺伝子を単離しクローニングできる。

【0078】

本発明に係る遺伝子（ポリヌクレオチド）を取得する方法は、上記スクリーニング法以外にも、PCR等の増幅手段を用いる方法がある。例えば、上記アダプタータンパク質T I C A M-1のcDNA配列のうち、5'側及び3'側の非翻訳領域の配列（又はその相補配列）の中からそれぞれプライマーを調製し、これらプライマーを用いてヒト・マウスのゲノムDNA（又はcDNA）等を鋳型にしてPCR等を行い、両プライマー間に挟まれるDNA領域を増幅することで、本発明のポリヌクレオチドを含むDNA断片を大量に取得できる。

【0079】

本発明に係るタンパク質を取得する方法についても、特に限定されるものではなく、例えば、上述のようにして取得された遺伝子（上記アダプタータンパク質 T I C A M-1 又はその相同分子等をコードする c D N A 等）を、周知の方法により大腸菌や酵母等の微生物又は動物細胞などに組み入れ、その c D N A がコードするタンパク質を発現させ精製することで、上記タンパク質アダプタータンパク質 T I C A M-1 等の本発明に係るタンパク質を容易に取得することができる。尚、このように宿主に外来遺伝子を導入する場合、外来遺伝子の組換え領域に宿主内で機能するプロモータを組み入れた組換え発現ベクター及び宿主には様々なものがあるので、目的に応じたものを選択すればよい。產生されたタンパク質を取り出す方法は、用いた宿主、タンパク質の性質によって異なるが、タグの利用等により比較的容易に目的のタンパク質を精製することが可能である。

【0080】

(3) アダプタータンパク質 T I C A M-1 及びその遺伝子等の有用性

アダプタータンパク質 T I C A M-1 は、以下の 2 種類の作用機序により、I 型インターフェロンの產生を亢進することができる。

【0081】

(a) ウイルスに感染した、T L R 3 を発現している宿主細胞内で、アダプタータンパク質 T I C A M-1 が、ウイルス由来の二本鎖 R N A を認識した T L R 3 と結合して、下流の I 型インターフェロンの產生誘導に至るシグナル伝達を誘導し、I 型インターフェロンの產生を強く亢進する。したがって、ウイルスに感染した宿主細胞において細胞特異的（局所的）に I 型インターフェロンの產生を強く亢進することができる。すなわち、ウイルスに対する免疫応答を亢進できる。

【0082】

(b) ウイルスに感染していない宿主細胞内で、アダプタータンパク質 T I C A M-1 が単独で発現して、下流の I 型インターフェロンの產生誘導に至るシグナル伝達を誘導し、I 型インターフェロンの產生を亢進する。このようなアダプタータンパク質 T I C A M-1 の単独発現でも高い I 型インターフェロン誘導活性がある。ただし、これによる I 型インターフェロンの產生量は (a) によるものと比較すると少ない。

【0083】

これらの結果として、アダプタータンパク質TICAM-1は、以下のような有用性を持つ。

【0084】

①アダプタータンパク質TICAM-1あるいはアダプタータンパク質TICAM-1を有効成分として含む混合物は、ウイルス感染症の予防・治療剤として極めて有用である。すなわち、主として(a)の作用機序によるI型インターフェロンの産生亢進の結果として、ウイルス感染時に、前述したI型インターフェロンによる抗ウイルス効果を、ウイルスに感染した宿主細胞において細胞特異的（局所的）に亢進できる。すなわち、ウイルス感染に対するI型インターフェロンによる生体防御機能を強化できる。したがって、I型インターフェロンの過剰な産生による自己免疫疾患等の副作用を最小限に抑制しながらウイルス感染症を予防または治療できる。適用されるウイルス感染症としては、現時点でI型インターフェロンの有効性が確認されている疾患、すなわち、ウイルス性のB型肝炎およびC型肝炎（特に遺伝子型がIIaのものに有効）等が挙げられる。また、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）によって引き起こされる後天性免疫不全症候群（AIDS；免疫不応答感染症）にも適用できると考えられる。また、アダプタータンパク質TICAM-1は、ウイルスの潜伏感染が予想される部位にアダプタータンパク質TICAM-1を発現させることにより、ウイルス感染の予防が可能である。また、アダプタータンパク質TICAM-1は、単独発現（(b)の作用機序）でも高いI型インターフェロン誘導活性があるので、TLR3が発現しない場合（(a)の作用機序が有効でない場合）にも十分な抗ウイルス作用を奏する。

【0085】

②アダプタータンパク質TICAM-1あるいはアダプタータンパク質TICAM-1を有効成分として含む混合物は、腫瘍の治療剤としても有用である。すなわち、上記(b)の作用機序によるI型インターフェロンの産生亢進の結果として、前述したI型インターフェロンによる抗腫瘍効果を亢進できるので、自然免疫療法による腫瘍（癌）の治療が可能となる。適用される腫瘍としては、現時点

で I 型インターフェロンの有効性が確認されている悪性腫瘍（肝がん、腎臓がん、若年性咽頭乳頭腫、悪性リンパ腫、脳腫瘍、膠芽腫、髄芽腫、星細胞腫、皮膚悪性黒色腫等）が挙げられる。

【0086】

なお、本発明に係る治療剤の標的となる細胞としては、ウイルスの二本鎖 RNA を認識する TLR3 をその表面上で発現するものであることが望ましいが、本発明に係るタンパク質は単独で I 型インターフェロンの産生を誘導することができるので、TLR3 をその表面上で発現しない細胞にも適用可能である。ただし、ウイルス感染症に適用する場合には、ウイルスの二本鎖 RNA を認識する TLR3 をその表面上で発現する細胞に導入する方が好ましい。これにより、ウイルス感染部位において局所的に I 型インターフェロンの産生を誘導することができ、I 型インターフェロンの産生量の増大による副作用を最小限に抑えながら、I 型インターフェロンの産生量の増大によるウイルス感染症の治療を効果的に行うことができる。

【0087】

本願発明者等の研究によれば、ヒト TLR3 は、様々な樹状細胞（DC）サブセットの中で発現される。また、ヒト TLR3 は、ヒト腸上皮細胞やヒト線維芽細胞の中で発現されることが報告されている（M. Muzio, D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'amico, A. Stoppacciro, R. Mancinelli C. van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena, A. Mantovani, J. Immunol. 164 (2000) 5998-6004 および E. Cario, D. K. Podolsky, Infect. Immun. 68 (2000) 7010-7017）。このことは、その機能が、自然免疫系における微生物核酸成分に対する応答と密接に関連していることを示唆している。したがって、本発明に係るウイルス感染症の治療剤は、ヒト TLR3 を発現してタイプ I インターフェロンを産生する細胞、特に、ヒト TLR3 をその表面上で発現すると共に、RNA ウイルスを認識したときに I 型インターフェロンを産生する細胞に対して効果的である。このような細胞としては、例えば、ヒト肺線維芽細胞やヒト包皮線維芽細胞等のヒト線維芽細胞、ヒト樹状細胞、ヒト腸上皮細胞等が挙げられる。特に、線維芽細胞は、RNA ウイルス感染または二本鎖 RNA による処理の際に、異なる複数のシグナル伝達経

路を経て I 型インターフェロンを産生することが知られており、大きな効果が期待できる。また、マウス TLR 3 を発現して I 型インターフェロンを産生する細胞としては、例えば、マウス線維芽細胞等の細胞が挙げられる。

【0088】

また、アダプタータンパク質 T I C A M-1 を含む予防・治療剤の投与方法としては、静脈注射、皮下注射などが好ましいが、舌下錠や直腸投与などの非経口投与でもよい。また、投与形態として、通常の蛋白質の製剤化法により製剤化されたものを使用できる。また、リポソーム製剤などの乳化剤として使用することもできる。

【0089】

アダプタータンパク質 T I C A M-1 は、上述した有用性に加えて、以下のような有用性を持つと考えられる。

【0090】

すなわち、上記(b)の作用機序による I 型インターフェロンの産生亢進の結果として、前述した I 型インターフェロンによる免疫調節効果を亢進できるので、ある種の自己免疫疾患の治療が可能になると考えられる。

【0091】

また、アダプタータンパク質 T I C A M-1 は、TLR 3 とアダプタータンパク質 T I C A M-1 との結合、あるいはアダプタータンパク質 T I C A M-1 から下流の I 型インターフェロンの産生に至るシグナル伝達を亢進する化合物や、このシグナル伝達を阻害する化合物（阻害剤）のスクリーニング等にも利用できると考えられる。

【0092】

また、後述の実施例において詳述するように、上記アダプタータンパク質 T I C A M-1 は、TLR 3 と結合し、I 型インターフェロンの産生を誘導する分子であり、上記 TLR 3 を介したシグナル伝達系において極めて重要な役割を果たす分子と考えられる。それゆえ、本発明に係る遺伝子およびタンパク質は、上記 TLR 3 を介したシグナル伝達系ならびにその調節機構を研究解析するための研究材料として有用であるばかりでなく、こうした研究を通じて、当該シグナル伝

達系やその調節機構に関わる種々の病気の病態解析にも有効利用できる可能性がある。

【0093】

(4) アダプタータンパク質 T I C A M-1 の変異体

タンパク質の変異体が、野生型と同様の活性・機能を有する例は既に多数知られている。そのため、アダプタータンパク質 T I C A M-1 と同様に T L R 3 と特異的に結合する性質および I 型インターフェロンの産生を誘導する性質を併せ持つアダプタータンパク質 T I C A M-1 の変異体を作製する方法についても、特に限定されるものではなく、例えば、部位特異的突然変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, Gene 152, 271-275 (1995) 他)、P C R 法等を利用して塩基配列に点変異を導入し変異体を作製する方法、あるいはトランスポゾンの挿入による突然変異株作製法などの周知の変異タンパク質作製法を用いて作製することができる。また、変異体の作製には、市販の突然変異誘発キット (例えば、ストラタジーン社製の位置指定突然変異誘発キット "QuickChange") を利用してもよい。この場合、位置を、T L R 3 と特異的に結合する性質および I 型インターフェロンの産生を誘導する性質を持つ領域と考えられる T I R ドメイン以外に変異を導入すれば、T L R 3 と特異的に結合する性質および I 型インターフェロンの産生を誘導する性質を併せ持つアダプタータンパク質 T I C A M-1 の変異体を確実に作製することができると考えられる。

【0094】

すなわち、後段の実施例で述べるように、ヒト T I C A M-1 を構成するアミノ酸配列のうちほぼ T o l l / インターロイキン 1 受容体に対して相同性を持つ領域 (T I R ドメイン) のみからなる、387~556 番目のアミノ酸配列からなる変異タンパク質が、ヒト T L R 3 と特異的に結合する性質および I 型インターフェロンの産生を誘導する性質を併せ持っていたことから、T I R ドメイン (ヒト T I C A M-1 を構成するアミノ酸配列のうちの 394~532 番目のアミノ酸配列あるいはマウス T I C A M-1 を構成するアミノ酸配列のうちの 396~534 番目のアミノ酸配列) を少なくとも有する変異体であれば、T L R 3 と特異的に結合する性質および I 型インターフェロンの産生を誘導する性質を併せ

持つと考えられる。

【0095】

TLR3と特異的に結合する性質およびI型インターフェロンの産生を誘導する性質を併せ持つアダプタータンパク質TICAM-1の変異体は、前述したアダプタータンパク質TICAM-1と同様の有用性、すなわち、①ウイルス感染症としての有用性、②腫瘍の治療剤としての有用性等を持つ。

【0096】

一方、アダプタータンパク質TICAM-1において、TLR3と特異的に結合する性質およびI型インターフェロンの産生を誘導する性質に重要な領域と考えられるTIRドメインに変異を生じさせれば、TLR3と特異的に結合する性質、I型インターフェロンの産生を誘導する性質のいずれか一方に異常を持つ変異タンパク質を作製できると考えられる。

【0097】

そして、後段の実施例で述べるように、ヒトTICAM-1を構成するアミノ酸配列のうちのほぼTIRドメイン（387～556番目のアミノ酸配列）のみからなる変異タンパク質に対してさらに434番目（完全長のヒトTICAM-1での位置）のアミノ酸（プロリン）をヒスチジンに置換する点変異を導入した変異タンパク質が、TLR3に対して特異的に結合する性質を保持する一方、I型インターフェロンの産生を誘導する性質を失ったことから、アダプタータンパク質TICAM-1あるいはTIRドメインを少なくとも有するその変異体に対して、TIRドメインのうち、少なくとも434番目のアミノ酸（プロリン）を含む一部領域に変異を導入すれば、ヒトTLR3に対して特異的に結合する性質を持つ一方、I型インターフェロンの産生を誘導する性質に異常を持つ変異タンパク質を作製できると考えられる。

【0098】

このようなTLR3に対して特異的に結合する性質を持つ一方、I型インターフェロンの産生を誘導する性質に異常を持つアダプタータンパク質TICAM-1の変異体は、TLR3から下流のI型インターフェロンの産生に至るシグナル伝達を阻害して、I型インターフェロンの産生を抑制することができる。その結

果、アダプタータンパク質 T I C A M-1 の制御を介した T L R 3 から下流の I 型インターフェロンの産生に至るシグナル伝達経路に起因した自己免疫疾患やアトピー性疾患等を治療できると考えられる。すなわち、上記変異タンパク質は、以下の有用性を有すると考えられる。

【0099】

(ア) 上記変異タンパク質またはそれを有効成分として含む混合物は、自己免疫疾患の治療剤として有用である。

【0100】

(イ) 上記変異タンパク質またはそれを有効成分として含む混合物は、アトピー性疾患の治療剤として有用である。

【0101】

一方、ヒト T I C A M-1 あるいは T I R ドメインを少なくとも有するヒト T I C A M-1 の変異体に対して、ヒト T L R 3 に対して特異的に結合する性質が失われるように、434 番目のアミノ酸（プロリン）以外の T I R ドメインの一部に変異を導入すれば、ヒト T L R に対して特異的に結合する性質を持つ一方、I 型インターフェロンの産生を誘導する性質に異常を持つ変異タンパク質を作製できると考えられる。

【0102】

このような T L R 3 に対して特異的に結合する性質を持つ一方、I 型インターフェロンの産生を誘導する性質に異常を持つ変異タンパク質は、前述したアダプタータンパク質 T I C A M-1 と同様に、ウイルス感染症の予防・治療剤としての有用性、腫瘍の治療剤としての有用性等を持つと考えられる。ただし、この場合、ウイルス感染症の予防・治療剤としての有用性は、前述した(a)の作用機序（ウイルス免疫応答）による I 型インターフェロンの産生亢進の結果ではなく前述した(b)の作用機序（アダプタータンパク質 T I C A M-1 の単独発現）による I 型インターフェロンの産生亢進の結果である。したがって、この変異体は、アダプタータンパク質 T I C A M-1 と比較すると、自己免疫疾患等の副作用を抑制する効果やウイルス抑制効果は低い。

【0103】

(5) 組換え発現ベクター

本発明に係る組換え発現ベクターは、前述したアダプタータンパク質 T I C A M-1 またはその変異体をコードする遺伝子を含むものである。

【0104】

この組換え発現ベクターは、種々の細胞に上記遺伝子を導入してその細胞内でアダプタータンパク質 T I C A M-1 を産生させることにより、種々の細胞内における T L R 3 を介したシグナル伝達系ならびにその調節機構を研究解析するための研究材料として有用であるばかりでなく、こうした研究を通じて、当該シグナル伝達系やその調節機構に関わる種々の病気の病態解析に有効利用できる可能性がある。

【0105】

また、公知の哺乳動物の標的細胞（宿主細胞）内に対して、この組換え発現ベクターに含まれる遺伝子を遺伝子導入法により導入し、その細胞内で発現させることで、前述したアダプタータンパク質 T I C A M-1 またはその変異体を生体内で産生させることができる。それゆえ、上記組換え発現ベクターは、含有する遺伝子がコードするタンパク質と同様の有用性を有する。すなわち、上記組換え発現ベクターは、含①ウイルス感染症の予防・治療剤としての有用性、②腫瘍の治療剤としての有用性、（ア）自己免疫疾患の治療剤としての有用性、（イ）アトピー性疾患の治療剤としての有用性等を持つ。

【0106】

なお、この組換え発現ベクターを用いて哺乳動物の標的細胞内に遺伝子を導入する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、(1)哺乳動物の疾患部位から標的細胞を採取し、採取した標的細胞に組換え発現ベクターを導入した後、哺乳動物の体内に戻す方法、(2)哺乳動物の局所の臓器や癌部にカチオン性リポソームと共に組換え発現ベクターを導入する方法、(3)組換え発現ベクターとしてレトロウイルスベクターやアデノウイルス等のウイルスベクターを用い、ウイルスベクターの感染力を利用して標的細胞内に遺伝子を導入する方法、(4)哺乳動物の局所の臓器や癌部に組換え発現ベクターを導入した後、電極で一定の電場を与えるエレクトロポレーション法等が挙げられる。

【0107】

腫瘍に対しアダプタータンパク質TICAM-1を全身投与した場合、腫瘍部位以外でも副作用の強いI型インターフェロンの産生が亢進されるので、副作用を回避しながら十分な抗腫瘍作用を維持するのが難しいことも考えられる。これに対し、上述した遺伝子導入法などの方法でアダプタータンパク質TICAM-1の局所濃度を挙げれば、腫瘍に対してより適応した治療法を実現できる。したがって、上記組換え発現ベクターは、腫瘍の治療剤として非常に有用である。

【0108】

(6) アダプタータンパク質TICAM-1に対する抗体

本発明に係る抗体は、アダプタータンパク質TICAM-1または変異体と特異的に結合する抗体である。

【0109】

上記抗体は、宿主細胞におけるアダプタータンパク質TICAM-1の発現の検出、アダプタータンパク質TICAM-1の製造・精製等に有用であると考えられる。

【0110】

さらに、アダプタータンパク質TICAM-1と特異的に結合する抗体、またはTLR3に対して特異的に結合する性質とI型インターフェロンの産生を誘導する性質とを併せ持つアダプタータンパク質TICAM-1の変異体と特異的に結合する抗体は、TLR3から下流のI型インターフェロンの産生に至るシグナル伝達を遮断して、I型インターフェロンの産生を抑制することができると考えられるので、前述したTLR3に対して特異的に結合する性質を持つ一方でI型インターフェロンの産生を誘導する性質に異常を持つ変異タンパク質と同様に、

(ア) 自己免疫疾患の治療剤としての有用性、(イ) アトピー性疾患の治療剤としての有用性を持つと考えられる。また、上記抗体を用いてI型インターフェロンの産生を阻害した状態で、目的遺伝子を挿入したウイルスベクターを宿主細胞に感染させれば、ウイルスベクターによる宿主細胞への目的遺伝子の導入効率を高められると考えられる。

【0111】

また、上記抗体は、診断薬としても使用できる可能性がある。すなわち、上記抗体を用いて診断対象の個体から採取した細胞におけるアダプタータンパク質 T I C A M-1（または同様の機能を持つ変異体）の発現の有無を検出すれば、この結果に基づいて個体がアダプタータンパク質 T I C A M-1 の欠損や変異に起因する免疫不全症にかかっているか否かを診断することができると考えられる。

【0112】

上記抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、モノクローナル抗体であることが好ましい。これは、性質が均一で供給しやすい、将来的にヒト型抗体に変えうる、ハイブリドーマとして半永久的に保存ができるなどの理由による。

【0113】

上記モノクローナル抗体は、次の方法により作製することができる。すなわち、まず、アダプタータンパク質 T I C A M-1、そのフラグメントまたはその他の誘導体、あるいはそれらのアナログ、もしくはそれらを発現する細胞を免疫原として用いてマウス脾臓リンパ球を免疫し、免疫したマウス脾臓リンパ球とマウスのミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを作製する。次いで、このハイブリドーマによりモノクローナル抗体を産生させる。なお、免疫操作は、公知の各種方法、例えば、ハイブリドーマ法（Kohler, G. and Milstein, C., Nature 256, 495-497 (1975)）、トリオーマ法、ヒト B-細胞ハイブリドーマ法（Kozbor, Immunology Today 4, 72 (1983)）および E B V-ハイブリドーマ法（Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss, Inc., 77-96 (1985)）などにより行うことができる。

【0114】

【実施例】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施例の記載に限定されるものではなく、本発明の範囲内で種々の変更が可能である。

【0115】

〔細胞株・細胞培養〕

ヒト肺線維芽細胞株 M R C-5 は、理化学研究所（茨城県つくば市高野台 3-1

1-1) の"Riken Cell Bank"に寄託されているものから取得した。また、ヒトの上皮細胞株 H e L a は、藤田尚志博士（東京都臨床医学研究所）から提供して頂いたものである。また、実施例で使用した H E K（ヒト胚腎臓）293細胞株は、ヒト T L R 3 は発現せず、ヒト T I C A M-1 の m R N A は極めて低いレベルで発現した（図示しない）。

【0116】

細胞株 M R C-5 および細胞株 H e L a は、それぞれ 5 重量%（H e L a）または 10 重量%（M R C-5）の熱不活性化 F C S（J R H バイオサイエンス社）と、抗生物質とを添加した M E M（改変イーグル培地）中で培養した。H E K 293細胞は、10重量%の F C S および抗生物質を添加した D M E M（ダルベッコ改変イーグル培地）中で培養した。

【0117】

〔試薬〕

ポリ（I：C）は、Amersham Pharmacia Biotech社から購入した。ポリミキシン（polymixin）B、抗原型 0111：B4 の大腸菌由来の L P S（リポ多糖；ヒト T L R 4 によって認識されるグラム陰性細菌の細胞壁成分；以下、「L P S」と略記する）、およびマウス I g G 1 は、Sigma社から購入した。マイコプラズマリポペプチド M A L P-2 は、M.Nishiguchi, M.Matsumoto, T.Takao, M.Hoshino, Y.Shimonishi, S.Tsuiji, N.A.Begum, O.Takuchi, S.Akira, K.Toyoshima, T.Seya, J.Immunol. 166 (2001) 2610-2616 に記載の方法で調製した。これらの試薬は、L P S を除いて、細胞刺激の前にポリミキシン B（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）によって 37°C で 1 時間処理した。

【0118】

〔ヒト T L R に対するモノクローナル抗体〕

ヒト T L R 3 に対するモノクローナル抗体（T L R 3. 7）およびヒト T L R 2 に対するモノクローナル抗体（T L R 2. 45）は、非特許文献 1 に記載されている方法（Xu, Y, et al., Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains, Nature 408: 111-115 (2000) も参照）で作製した。ヒト T L R 4 に対するモノクローナル抗体は、三宅健介博士（東

京大学医化学研究所) から提供して頂いたものである (作製法については、R. Shimazu, S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, M. Kimoto, J. Exp. Med. 189 (1999) 1777-1782 参照)。

【0119】

〔cDNA 発現ベクター〕

ヒト TLR 2、ヒト TLR 3、MyD88、および Mal/TIRAP の cDNA を、組換え体ヒト GM-CSF (Peprotech 社製) と共に 9 日間培養したヒトの単核細胞から得られた cDNA から PCR によって生成し、哺乳動物の発現ベクター pEFBOS 中にクローニングすることで、ヒト TLR 2 発現ベクター、ヒト TLR 3、MyD88 発現ベクター、および Mal/TIRAP 発現ベクターとした。なお、発現ベクター pEFBOS は、大阪大学の長田重一教授から提供して頂いたプラスミドベクターである。

【0120】

ヒト TLR 4 発現ベクターおよび MD-2 発現ベクターは、三宅健介博士 (東京大学医化学研究所) から提供して頂いたものである (Shimazu, R., et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. J. Exp. Med. 189: 1777-1782 (1999) 参照)。

【0121】

N 末端に Flag タグ (Flag 標識) を付けたヒト TLR 4 発現ベクターおよび N 末端に Flag タグを付けたヒト TLR 2 発現ベクターはそれぞれ、ヒト TLR 4 およびヒト TLR 2 をコードする cDNA を、N 末端に Flag タグを付けたプラスミドベクター pCMV-Flag (Sigma 社製) に組み込むことにより作成した。

【0122】

ヒト CD14 発現ベクター (pME18S/CD14) は、西村仁博士 (筑波大学) から提供して頂いたものである。

【0123】

TIR ドメインを欠失させたヒト TLR 3 の変異体 (TLR 3 を構成するアミノ酸配列のうち 1~729 番目のアミノ酸配列からなるタンパク質; 以下、「ヒト TLR 3 deICYT」と記す;) をコードする cDNA は、ヒト TLR 3 の

cDNAからPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）によって作製し、発現ベクターpEFBOS中にクローニングしてヒトTLR3 deICYT発現ベクターとした。

【0124】

ヒトMyD88の顕性不活性（ドミナントネガティブ）な変異体（ヒト由来のアダプタータンパク質MyD88を構成するアミノ酸配列のうち52～296番目のアミノ酸配列からなるタンパク質；以下、「TIRMyD88」と記す）をコードするcDNAは、骨髓細胞株P39のcDNAからPCRによって作製し、発現ベクターpEFBOS中に組み込んでTIRMyD88発現ベクターとした。

【0125】

ヒトTLR3における795番目のアミノ酸（アラニン）をヒスチジンに置換した変異体（Ala795His；以下、「ヒトTLR3 A795H」と記す）をコードする発現ベクター、およびアダプター分子Mal/TIRAPの顕性不活性な変異体（アダプター分子Mal/TIRAPにおける125番目のアミノ酸（プロリン）をヒスチジンに置換した顕性不活性な変異体；Mal Pro125His；以下、「Mal P125H」と記す）をコードするcDNAは、それぞれヒトTLR3およびMal/TIRAPから「Quick-change」位置指定突然変異誘発キット（Stratagene社製）を用いて生成した。そして、ヒトTLR3 A795HをコードするcDNA、およびMal P125HをコードするcDNAをそれぞれプラスミドベクターpEFBOSに組み込むことにより、ヒトTLR3 A795H発現ベクターおよびMal P125H発現ベクターを得た。

【0126】

〔実施例1；リポーター遺伝子発現アッセイ〕

HEK293細胞のトランスフェクションにより、ヒトTLR3が、二本鎖RNAの類似体であるポリ（I：C）の存在をアダプター分子MyD88またはMal/TIRAPを介してシグナル伝達するかどうか調べた。

【0127】

まず、リポーター遺伝子発現アッセイによりNF- κ Bの活性化の度合いを分析した。

【0128】

24ウェルのプレート上のHEK（ヒト胚腎臓）293細胞（1ウェル当たり 2×10^5 個）を、遺伝子導入用カチオン性脂質「Lipofectamine 2000」試薬（Gibco社製）を用いて、ルシフェラーゼを連結したNF- κ Bレポータ遺伝子（Stratagene社製、 $0.1 \mu\text{g}$ ）と、（1）空ベクター、（2）TIRMyD88発現ベクター（ $0.2 \mu\text{g}$ ）、（3）TIRMyD88発現ベクター（0、 $0.05 \mu\text{g}$ 、 $0.2 \mu\text{g}$ 、または $0.6 \mu\text{g}$ ）およびヒトTLR2発現ベクター（ $0.1 \mu\text{g}$ ）、（4）空ベクター、（5）TIRMyD88発現ベクター（ $0.2 \mu\text{g}$ ）、（6）TIRMyD88発現ベクター（0、 $0.05 \mu\text{g}$ 、 $0.2 \mu\text{g}$ 、または $0.6 \mu\text{g}$ ）およびヒトTLR3発現ベクター（ $0.1 \mu\text{g}$ ）、（7）空ベクター、（8）MalP125H発現ベクター（ $0.2 \mu\text{g}$ ）、（9）MalP125H発現ベクター（0、 $0.2 \mu\text{g}$ 、または $0.6 \mu\text{g}$ ）およびヒトTLR4/CD14/MD-2発現ベクター（ $0.3 \mu\text{g}$ ）、（10）空ベクター、（11）MalP125H発現ベクター（ $0.2 \mu\text{g}$ ）、または（12）MalP125H発現ベクター（0、 $0.2 \mu\text{g}$ 、または $0.6 \mu\text{g}$ ）およびヒトTLR3発現ベクター（ $0.1 \mu\text{g}$ ）とによって、過渡的にトランスフェクトした。空ベクターを添加することによって、トランスフェクトされるDNAの総量（ $0.8 \sim 1.0 \mu\text{g}$ ）を調整した。また、内部コントロールとして、プラスミドベクターpCMV β （Clontech社製； 5 ng ）を用いた。

【0129】

なお、「空ベクター」はcDNAを組み込んでいないプラスミドベクターpEFBOSである。また、「ヒトTLR4/CD14/MD-2発現ベクター」とは、ヒトTLR4発現ベクターとヒトCD14発現ベクターとMD-2発現ベクターとの組み合わせを指す。

【0130】

トランスフェクトの24時間後に、（1）～（3）のトランスフェクト後の細胞を培地のみまたはポリミキシンBで処理したMALP-2（ 100 nM ）で、（

4) ~ (6) および (10) ~ (12) のトランスフェクト後の細胞を培地のみまたはポリミキシンBで処理したポリ (I : C) ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) で、(7) ~ (9) のトランスフェクト後の細胞を培地のみまたはLPS ($100 \text{ ng}/\text{ml}$) で、それぞれ6時間刺激した。続いて、細胞を溶出バッファ (Promega社製) で溶出した。この溶出液について、トランスフェクト後の刺激によるNF- κ Bの活性化の度合いを表すルシフェラーゼの活性を、製造業者の使用説明書に従って測定した。また、計3回の実験を行い、それらの代表値を測定値とした。

【0131】

トランスフェクト後に刺激を与えた細胞のルシフェラーゼ活性の測定値を、図1 (a) ~ (d) に灰色または黒色で示し、トランスフェクト後に刺激を与えなかった (培地のみで刺激した) 細胞のルシフェラーゼ活性の測定値を、図1 (a) ~ (d) に白色で示す。ルシフェラーゼ活性の測定値は、トランスフェクト後に刺激を与えなかった細胞のルシフェラーゼ活性を1とした相対値 (相対刺激) で表している。

【0132】

次に、p-125 lucリポータープラスミドを用いたリポーター遺伝子発現アッセイによりインターフェロン β プロモータの活性化の度合いを分析した。

【0133】

この「p-125 lucレポータプラスミド」は、東京大学大学院医学系研究科の谷口維紹教授から供与して頂いたものである (T.Taniguchi, K.Ogasawara, A.Takaoka, N.Tanaka, Annu.Rev.Immunol. 19 (2001) 623-655参照)。p-125 lucレポータプラスミドは、レポータ遺伝子発現ベクターとしての「ピッカジーン (Picagene)」ルシフェラーゼレポータプラスミド (東洋インキ株式会社製) に対して、ヒトインターフェロン β プロモータをコードする領域 (-125 ~ +19) を挿入したものである。

【0134】

p-125 lucリポータープラスミドを用いたリポーター遺伝子発現アッセイでは、ルシフェラーゼを連結したNF- κ Bレポータ遺伝子に代えてp-125 lucリポータープラスミド ($0.1 \mu\text{g}$) を用いる点と、(1) ~ (3

)のベクターに代えて、(1')空ベクター、(2')Ma1P125H発現ベクター(0.2 μ g)、または(3')Ma1P125H発現ベクター(0.0.2 μ g、または0.6 μ g)およびヒトTLR4/CD14/MD-2発現ベクター(0.3 μ g)を用いる点と、(1)~(3)のベクターを用いてトランスフェクトした細胞を培地のみまたはLPS(100ng/ml)で刺激する点とを除いて、ルシフェラーゼを連結したNF- κ Bレポーター遺伝子を用いたリポーター遺伝子発現アッセイと同様の操作を行った。

【0135】

そして、トランスフェクト後の刺激によるインターフェロン β プロモータの活性化の度合いを表すルシフェラーゼの活性を測定した。得られた測定値を、図2(a)~(d)に図1(a)~(d)と同様の形態で示す。

【0136】

本実施例では、以下の結果が得られた。

【0137】

まず、アダプター分子MyD88の顕性不活性な変異体TIRMyD88の発現は、その量に応じてヒトTLR2を介したヒトTLR2のリガンドMALP-2によるNF- κ Bの活性化を著しく阻害した(図1(a))。これに対して、アダプター分子MyD88の顕性不活性な変異体TIRMyD88の発現は、ヒトTLR3を介したポリ(I:C)によるNF- κ Bおよびインターフェロン β プロモーターの活性化にはほとんど影響を与えなかった(図1(b)および図2(b))。

【0138】

アダプター分子Ma1/TIRAPの顕性不活性な変異体Ma1P125Hを用いた類似の実験において、アダプター分子Ma1/TIRAPがヒトTLR3を介するシグナル伝達に寄与しないことも示された(図1(d)および図2(d))。

【0139】

それとは対照的に、ヒトTLR4を介するLPSによるNF- κ Bおよびインターフェロン β プロモーターの活性化は、アダプター分子Ma1/TIRAPの

顕性不活性な変異体M a l P 1 2 5 Hによってその量に応じて阻害された（図1（c）、図2（c））。

【0140】

以上の結果から、ヒトTLR3によって媒介されたインターフェロン β の産生を誘導するシグナル伝達は、既知のアダプター分子M y D 8 8およびM a l / T I R A Pに依存しないことが分かった。

【0141】

〔実施例2；リポーター遺伝子発現アッセイ〕

24ウェルのプレート上のHEK（ヒト胚腎臓）293細胞（1ウェル当たり 2×10^5 個）を、遺伝子導入用カチオン性脂質「リポフェクトアミン(Lipofectamine) 2000」試薬（Gibco社製）を用いて、ルシフェラーゼを連結したNF- κ Bレポータ遺伝子（Stratagene社製、 $0.1 \mu\text{g}$ ）またはp-125 lucリポータープラスミド（ $0.1 \mu\text{g}$ ）と、空ベクター、ヒトTLR3発現ベクター（ $0.1 \mu\text{g}$ ）、ヒトTLR3 delCYT発現ベクター（ $0.1 \mu\text{g}$ ）、またはヒトTLR3 A795H発現ベクター（ $0.1 \mu\text{g}$ ）とによって、過渡的にトランスフェクトした。

【0142】

トランスフェクトの24時間後に、（1）～（3）のトランスフェクト後の細胞を培地のみまたはポリミキシンBで処理したポリ（I：C）で6時間刺激した。続いて、細胞を溶出バッファ（Promega社製）で溶出した。この溶出液について、ルシフェラーゼの活性を測定した。また、計3回の実験を行い、それらの代表値を測定値とした。

【0143】

トランスフェクト後に刺激を与えた細胞のルシフェラーゼ活性の測定値を、図3（a）（b）に黒色で示し、トランスフェクト後に刺激を与えなかった（培地のみで刺激した）細胞のルシフェラーゼ活性の測定値を、図3（a）（b）に白色で示す。ルシフェラーゼ活性の測定値は、トランスフェクト後に刺激を与えなかった細胞のルシフェラーゼ活性を1とした相対値（相対刺激）で表している。

【0144】

本実施例では、以下の結果が得られた。

【0145】

ヒトTLR3からTIRドメインを削除したタンパク質であるヒトTLR3 de1CYTをコードするcDNAをトランスフェクトした細胞は、同様に、ポリ(I:C)に応答しなかった(図3)。

【0146】

ヒトTLR3の突然変異体ヒトTLR3 A795HをコードするcDNAをトランスフェクトした細胞は、TLR3 de1CYTと同様に、ポリ(I:C)に対する応答性を失った。この結果は、ヒトTLR3における795番目のアミノ酸(アラニン)の点突然変異が、NF- κ Bへの下流のシグナル伝達にとっても、インターフェロンプロモーター β の活性化にとっても、極めて重大であることを示唆している。

【0147】

これに対して、TIRドメインを含むヒトTLR3を発現している細胞は、ポリ(I:C)による刺激の下でインターフェロン β プロモーターを活性化した(図3(b))。

【0148】

[実施例3；新規アダプター分子のスクリーニングおよび同定]

まず、酵母ツー・ハイブリッド・システムから、ヒトTLR3の末端は、あるタンパク質と特異的に会合することが確認された(図4)。

【0149】

次に、ヒトTLR3のシグナル伝達に関与するアダプター分子を同定するために、酵母ツー・ハイブリッド・システムを用いてスクリーニングを行った。

【0150】

すなわち、ヒトTLR3のTIRドメインに対して特異的に結合する新規アダプター分子のスクリーニングは、酵母ツー・ハイブリッド・システム「マッチメーカー(MATCHMAKER)ツー・ハイブリッド・システム3」(CLONTECH社製)を用いて、cDNAライブラリーの中からヒトTLR3のTIRドメインと相互作用するタンパク質を探索する方法で行った。

【0151】

すなわち、まず、転写因子 GAL 4 の DNA 結合ドメインの融合ベクターであるプラスミドベクター pGBKT7 (CLONTECH社製) のマルチクローニング・サイトに対し、ヒト TLR 3 の TIRドメイン (ヒト TLR 3 を構成するアミノ酸配列のうち 745～904 番目のアミノ酸配列) およびヒト TLR 4 の TIRドメイン (ヒト TLR 3 を構成するアミノ酸配列のうち 625～799 番目のアミノ酸配列) をコードする cDNA をそれぞれ挿入することにより、いわゆる餌(bait)プラスミドベクターとして、プラスミドベクター pGBKT7-TLR 3 およびプラスミドベクター pGBKT7-TLR 4 を作製した。また、転写因子 GAL 4 の活性化ドメインの融合ベクターであるプラスミドベクター pGADT7 (CLONTECH社製) に対し、ヒトの肺由来の「マッチメーカー」cDNAライブラリー (CLONTECH社製) を組み込んで、いわゆる獲物プラスミドベクター群を作製した。

【0152】

そして、酵母培地において、酵母細胞株 AH109 (CLONTECH社製) を、餌プラスミドベクター pGBKT7-TLR 3 と、「マッチメーカー」cDNAライブラリーより作製した獲物プラスミドベクター群とで形質転換した。酵母培地としては、Sherman, F., Fink, G. R., & Hicks, J. B. Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor press. (1986) に記載されたものを用いた。

【0153】

酵母ツー・ハイブリッド・システムでは、獲物プラスミドベクターと餌プラスミドベクターとが相互作用する場合にのみ、酵母細胞がプレート上で増殖できる。この場合、スクリーニング対象の 1,000,000 の形質転換体から、5つのクローンが SD-Trp-Leu-His-Ad e プレート (トリプトファン、ロイシン、ヒスチジン、およびアデニンのない SD (Synthetic Dropout) 培地プレート) 上で成長した。

【0154】

これらのクローンからプラスミドを回収し、プラスミド内の挿入部位の配列を

解析した。

【0155】

B L A S T 検索解析により、クローン 2.3A1-1 が N C B I の E S T (Expressed Sequence Tag) 配列から推定されたヒトの仮定的な m R N A 配列 C L 24751 を含むことが明らかとなった。挿入部位の 5' 領域内の 12 塩基対が、仮定の m R N A 「L O C 148022」の 3' 末端と重なった。

【0156】

C L 24751 は、ヒトのゲノムにおいて L O C 148022 からたった 75 b p しか離れていなかったという事、および L O C 148022 の 3' 末端がポリアデニル酸末端を持たないという事は、これら 2 つの注釈付きの m R N A が 1 つの転写から得られたことを示唆している。

【0157】

これを確認するために、L O C 148022 中に位置している 5' プライマーおよび C L 24751 中の 3' プライマーを用いて R T - P C R を行った。種々の細胞および組織の m R N A から、予想された D N A 断片を増幅することに成功した。これにより、本願発明者等は、L O C 148022 および C L 24751 がそれぞれ、新規アダプタータンパク質をコードする c D N A の 5' 断片および 3' 断片であると結論した。P C R によって得られた 2 つの c D N A 断片を連結することによって、完全長の c D N A が得られた。

【0158】

本願発明者等は、このタンパク質を「T I C A M - 1 (T I R 含有アダプター分子-1)」と命名した。

【0159】

また、本願発明者等は、以下の方法でヒト T I C A M - 1 に対して相同性を持つマウス由来のタンパク質 T I C A M - 1 (マウス T I C A M - 1) を見いだした。

【0160】

まず、E S T に登録されているマウスの c D N A の塩基配列からヒト T I C A M - 1 に相同性を有する配列を探索したところ、ヒト T I C A M - 1 に相同性を

有するマウスLOC224899が見つかり、この塩基配列がヒトTICAM-1のマウス相同体をコードするcDNAの塩基配列であるものと推定された。

【0161】

そこで、ヒトTICAM-1のマウス相同体をコードするものと推定されたマウスLOC224899のアミノ酸配列について、BLASTプログラムにより、ヒトTICAM-1のアミノ酸配列との相同性検索解析を行った。解析結果を図5に示す。なお、ヒトTICAM-1タンパク質およびマウスTICAM-1タンパク質のアミノ酸配列は、cDNAの塩基配列から推定した。また、これらタンパク質のアミノ酸配列は、ClustalWを用いてアラインメントした。

【0162】

図5において、ヒトTICAM-1のアミノ酸配列を「TICAM-1. hu」、マウスLOC224899のアミノ酸配列を「TICAM-1. mu」と表している。図5において、アスタリスク(*)は同一の残基を示し、2点(:)は保存された置換を示し、1点(.)は準保存された置換を示す。

【0163】

図5の結果から、ESTから推定したマウスLOC224899のアミノ酸配列が、ヒトTICAM-1のアミノ酸配列と非常に類似しており、それゆえ、マウスLOC224899が、ヒトTICAM-1のマウス相同体である可能性が高いことが明らかとなった。このことから、マウスLOC224899を、ヒトTICAM-1のマウス相同体「マウスTICAM-1」と同定した。

【0164】

また、ヒトTICAM-1およびマウスTICAM-1は、図5中に上線で示すTIRに類似したモチーフ(TIRドメイン)を持っており、その領域はヒトTICAM-1では394～532番目のアミノ酸配列であり、マウスTICAM-1では396～534番目のアミノ酸配列であった。

【0165】

このマウスTICAM-1は、ヒトTICAM-1のTIRドメイン中のN末端領域およびC末端領域にあるプロリン・リッチな領域が部分的に欠失していた(図5参照)。マウスTICAM-1は、ヒトTICAM-1に対して54%の

同一性を持っていた。

【0166】

なお、ヒト TICAM-1 およびマウス TICAM-1 の cDNA 配列およびアミノ酸配列は、DDBJ データベースに登録済（本願出願時には未公表）であり、それらの Genbank アクセッション番号はそれぞれ AB086380 および AB091053 である。

【0167】

〔実施例 4；酵母ツー・ハイブリッド・システムによる相互作用の解析〕

酵母ツー・ハイブリッド・システムにより、ヒト TLR3 とヒト TICAM-1 との間の相互作用を解析した。

【0168】

すなわち、まず、プラスミドベクター pGADT7（CLONTECH 社製）に対し、TICAM-1 遺伝子の部分的な断片を含むと推定された cDNA をプラスミドベクター pGADT7 のマルチクローニングサイトに組み込んで、いわゆる獲物ベクターとしてのプラスミドベクター pGADT7-TICAM-1 を作製した。また、獲物ベクターとしては、このプラスミドベクター pGADT7-TICAM-1 と、コントロールとしてのプラスミドベクター pGADT7 とを用いた。

【0169】

一方、餌ベクターとしては、前述したプラスミドベクター pGBKT7-TLR3 および pGBKT7-TLR4 と、コントロールとしてのプラスミドベクター pGBKT7（CLONTECH 社製）とを用いた。

【0170】

そして、実施例 4 で用いたのと同じ酵母培地において、酵母細胞株 AH109（CLONTECH 社製）を、2 種類の獲物プラスミドベクターのいずれか（プラスミドベクター pGADT7 または pGADT7-TICAM-1）と、3 種類の餌プラスミドベクターのいずれか（プラスミドベクター pGBKT7、pGBKT7-TLR3、または pGBKT7-TLR4）とで形質転換し、SD-His-Trp-Leu-Ad e プレート上で画線培養した。結果を図 4 に示す。

【0171】

この場合、上記の全ての組み合わせのうち、獲物プラスミドベクター p G A D T 7-T I C A M-1 と餌プラスミドベクター p G B K T 7-T L R 3 との組合せだけが、細胞を増殖することができた。また、酵母ツー・ハイブリッド・システムにおいて、ヒト T L R 3 に代えてヒト T L R 2 を用いた場合にも、酵母中で T I C A M-1 がクローニングされなかった（図示しない）。

【0172】

これにより、酵母ツー・ハイブリッド・システムによるスクリーニングによって同定された p G A D T 7-T I C A M-1 が、ヒト T L R 3 の T I R ドメインに対して特異的に結合するアダプタータンパク質 T I C A M-1（ヒト T I C A M-1）をコードする遺伝子の部分的な断片を含んでいることが確認された。

【0173】

〔実施例5；T I R ドメインの比較〕

ヒトおよびマウスの T I C A M-1、M a l（T I R A P）、および M y D 8 8 の T I R ドメインのアラインメントを行い、これらを比較した。

【0174】

ヒト T I C A M-1 の T I R ドメイン（394～532番目のアミノ酸配列）、マウス T I C A M-1 の T I R ドメイン（396～534番目のアミノ酸配列）、ヒト M y D 8 8（アクセッション番号 U 7 0 4 5 1）の T I R ドメイン（160～296番目のアミノ酸配列）、およびヒト M a l / T I R A P（アクセッション番号 A F 4 0 6 6 5 2）の T I R ドメイン（85～216番目のアミノ酸配列）を、C l u s t a l W を用いてアラインメントした。T I R ドメインの位置は、S M A R T プログラムを用いて推定した。アラインメントした結果を図6に示す。

【0175】

図6中においても、「T I C A M-1. h u」および「T I C A M-1. m u」はそれぞれ、「ヒト T I C A M-1」および「マウス T I C A M-1」を表す。また、アステリスク（*）は同一の残基を示し、2点（:）は保存された置換を示し、1点（.）は準保存された置換を示す。B o x 1～3の詳細については

、前述した文献を参照。

【0176】

〔実施例6；TICAM-1の検出〕

ヒトの多数の組織中におけるTICAM-1のmRNAの発現を、ノーザンブロットキット（CLONTECH社製）を用いたノーザンブロット法で解析した。すなわち、ヒトの12レーンの「Human MTN Blot」メンブレンおよび「Blot It」メンブレン（CLONTECH社製）を用いて、ヒトの多数の組織から抽出したmRNAを変性条件下で電気泳動した。電気泳動のパターンをフィルターにトランスファーし、C末端TICAM-1プローブ（ヒトTICAM-1をコードするcDNAの1406～2193番目の塩基配列を³²Pで標識したもの）を用いて厳しい条件でハイブリダイズした。「BAS2000」画像解析装置（富士フィルム株式会社製）を用いて1日間露出を行うことによりフィルター上のパターンを撮像した。結果を図7の上段に示す。

【0177】

コントロールとして標識した β -アクチンプローブを用いて同様の操作を行い、4時間露出でフィルター上のパターンを撮像した。結果を図7の下段に示す。

【0178】

図7に示すように、末梢血白血球（PBL）、脳(brain)、脾臓(spleen)、胸腺(thymus)、肝臓(liver)、肺(lung)、腎臓(kidney)、骨格筋(skeletal muscle)、心臓(heart)、および胎盤(placenta)を含むたいの組織において、2.6キロベース（kb）のヒトTICAM-1のmRNAが検出された。

【0179】

〔実施例7；RT-PCRによるTICAM-1の検出〕

図8に示す複数種のヒト細胞およびヒト細胞株からトータルのRNAを単離し、ヒトTICAM-1のプライマーを用いてRT-PCRを行った。PCRサイクルは35サイクル実行した。

【0180】

図8において、MfおよびiDCはそれぞれ、マクロファージおよび未熟樹状細胞を表す。「-」は、鋳型なしのコントロールを示す。また、 β -アクチン

ライマーをコントロールとして用いてPCRサイクルを20サイクル実行した。

【0181】

ヒト末梢血から用意した、未熟樹状細胞 (iDC)、マクロファージ (MΦ)、およびNK (ナチュラルキラー) 細胞は全て、ヒトTICAM-1のmRNAを発現した (図8)。また、リンパ系の細胞株 (T細胞CCRF-CEM、T細胞Molt-4、B細胞Namalwa) および線維芽細胞の細胞株 (MRC5) も、ヒトTICAM-1のmRNAが陽性であった (図8)。

【0182】

これらの結果を総合すれば、ヒトTICAM-1の発現がβ-アクチンの発現と比較して遍在しており、かつ、弱いと推論される。

【0183】

〔実施例8；免疫沈降法によるTICAM-1とTLR3の相互作用解析〕

ヒトTLR3のTIRドメインとTICAM-1との会合は、ヒトTLR3 (Flag標識付) およびヒトTICAM-1 (HA標識付) を発現しているHEK293細胞の免疫沈降法 (イムノプレシピテーション) によって確認した。

【0184】

まず、6ウェルのプレートで、HEK293細胞を、Lipofectamine 2000試薬 (Gibco社製) を用い、ヒトTLR3-Flag発現ベクター (Flagタグ付きTICAM-1発現ベクター) 3μgおよびTICAM-1-HA発現ベクター (HAタグ付きTICAM-1発現ベクター) 0.5μgで過渡的にトランスフェクトした。このとき、空ベクターを加えることによって、DNAの総量を一定 (4μg) に保った。

【0185】

トランスフェクトの24時間後、細胞を、培地のみ (図9のレーン1およびレーン3)、あるいはポリ (I:C) 10μg/ml (図9のレーン2およびレーン4) で15分間刺激し、溶出バッファ (pH7.5；25mMのTris、150mMのNaCl、1重量%のNP40、2mMのPMSE、25mMのインドアセトアミド、および10mMのEDTAを含む) 中に溶出させた。

【0186】

遠心分離後に、細胞溶出液を、免疫沈降プローブ (I P) としてマウス I g G 1 (図9のレーン1およびレーン2) または抗F l a g M 2抗体 (図9のレーン3およびレーン4 ; Sigma社製) と共に4℃で2時間かけてインキュベートし、免疫沈降させた。コントロール反応のために、マウス I g G 1を用いた。免疫複合体を、プロテインG-セファロースにより沈降させ、沈降物を良く洗浄した。

【0187】

そして、1重量%のSDS、0.2重量%のNP-40、および5重量%の2-メルカプトエタノールを含むDPBSを加えて煮沸することによって、免疫沈降したタンパク質を抽出した。次に、抽出物を抗F l a g抗体または抗HA抗体を用いて免疫ブロットした後、SDS-PAGEを行った。溶出液も、トランスフェクトされたTICAM-1-HAの発現を調べるために免疫ブロットした。

【0188】

得られた結果 (ウエスタンブロット ; WB) を図9に示す。なお、表中の、+はそれでトランスフェクションあるいは刺激をしたことを、-はそれでトランスフェクションあるいは刺激をしなかったことを示す。また、中央パネルは細胞溶出液の一部のウエスタンブロット (免疫ブロット) であり、下パネルは細胞溶出液全体のウエスタンブロットである。

【0189】

図9に示すように、ヒトTLR3およびヒトTICAM-1との両方を含む分子複合体が、抗F l a g抗体を用いた免疫沈降によって検出された (図9のレーン3およびレーン4 ; 上パネルの矢印で指す位置)。したがって、ヒトTICAM-1が、ヒトTLR3と会合することが確認された。

【0190】

また、ヒトTLR3に対する特定のモノクローナル抗体TLR3. 7 (非特許文献1参照) の存在下においても、類似のヒトTLR3とヒトTICAM-1との会合が確認された (図示しない)。また、ヒトTLR3を発現した細胞のポリ (I : C) による刺激は、この分子会合にほとんど影響を与えなかった (図9)。

【0191】

細胞溶出液全体のウエスタンブロット (WB) は、T I C A M-1-H A (中央パネルの矢印で指している位置) の発現を示した。細胞溶出液全体のウエスタンブロットでは、ヒト T I C A M-1 のメジャーバンドの上の高分子量型も検出された (図 9 の上パネル)。これは、リン酸化型を表すと考えられる。

【0192】

次に、同じ条件の下で、他の T L R および T L R 3 変異体に対して T I C A M-1 が結合するかを調べた (図 10)。

【0193】

まず、H E K 2 9 3 細胞は、ヒト T I C A M-1-H A ($0.05 \mu\text{g}$) と共に、空ベクター ($4 \mu\text{g}$) あるいはヒト T L R 3-F l a g 発現ベクター ($3 \mu\text{g}$)、T L R 3 A 7 9 5 H-F l a g 発現ベクター ($3 \mu\text{g}$)、F l a g-T L R 2 発現ベクター ($2 \mu\text{g}$)、F l a g-T L R 4 発現ベクター ($2 \mu\text{g}$)、あるいは M D-2 発現ベクター ($1 \mu\text{g}$) で過渡的にトランスフェクトした。このとき、空ベクターを加えることによって、DNA の総量を一定 ($4 \mu\text{g}$) に保った。トランスフェクトの 24 時間後に、細胞を溶出バッファで溶出した。

【0194】

溶出液をマウス I g G 1 (図示しない) または抗 F l a g M 2 抗体 (レーン 1 ~ 5) で免疫沈降した。そして、1 重量%の S D S、0.2 重量%の N P-40、および 5 重量%の 2-メルカプトエタノールを含む D P B S を加えて煮沸することによって、免疫沈降したタンパク質を抽出した。次に、抽出物を抗 F l a g 抗体または抗 H A 抗体を用いて免疫ブロットした後、S D S-P A G E を行った。溶出液も、トランスフェクトされた T I C A M-1-H A の発現を調べるために免疫ブロットした。抗 F l a g 抗体または抗 H A 抗体を用いて免疫ブロットを行った。

【0195】

得られた結果を図 10 に示す。なお、表中の、+ はそれでトランスフェクションをしたことを、- はそれでトランスフェクションをしなかったことを示す。図 10 の上パネルは、免疫沈降された F l a g タグ付き T L R タンパク質を示す。図 10 の中パネルは、(レーン 2 だけ示す) 野生型の T L R 3 (カッコあるいは

矢印) と相互作用するT I C A M-1を示す。図10の下パネルは、トランスフェクトされたT I C A M-1-H A (矢印) の発現を示す。

【0196】

図10に示すように、ヒトT L R 3は、ヒトT I C A M-1と共沈したが、T L R 3変異体A 7 9 5 H、T L R 2、およびT L R 4とは共沈しなかった。すなわち、A 7 9 5 H T L R 3変異体は、T I C A M-1と結合する能力を失った(図10)。T L R 2およびT L R 4は、M D-2と共発現した場合でさえ、T I C A M-1を共沈できなかった(図10)。これらの結果は、T L R 2に対するモノクローナル抗体およびT L R 4に対するモノクローナル抗体を用いた場合にも、確認された(図示しない)。

【0197】

これらの結果から、ヒトT I C A M-1がヒトT L R 3に対して特異的に結合することが確認された。

【0198】

また、T L R 2、T L R 3、およびT L R 4に対するモノクローナル抗体を用いた実験における、イースト・ツー・ハイブリッド分析および特異性確認の結果を総合すれば、ヒト細胞中において、ヒトT L R 3のT I Rドメインはアダプタータンパク質T I C A M-1と会合できることができる一方、T L R 2やT L R 4はアダプタータンパク質T I C A M-1と会合できないと結論できる。

【0199】

〔実施例9；ヒトT I C A M-1およびその変異体の発現ベクター作製〕

図11に示すように、ヒトT I C A M-1と、その3種類の変異体、すなわちヒトT I C A M-1の1~288番目のアミノ酸配列を欠失させた変異体(以下、「ヒトT I C A M-1 (ΔN288)」と表記する)、ヒトT I C A M-1の1~386番目のアミノ酸配列を欠失させた変異体(以下、「ヒトT I C A M-1 (ΔN386)」と表記する)、およびほぼヒトT I C A M-1のT I Rドメインのみからなる変異体(以下、「ヒトT I C A M-1 T I R」と表記する)をそれぞれコードする3種類の発現ベクターを作製した。上記のほぼヒトT I C A M-1のT I Rドメインのみからなる変異体(ヒトT I C A M-1 T I R)は、より

詳細には、ヒトTICAM-1の1~386番目のアミノ酸配列と557~712番目のアミノ酸配列とを欠失させた変異体、すなわちヒトTICAM-1を構成するアミノ酸配列のうち387~556番目のアミノ酸配列からなる変異タンパク質を作製した。

【0200】

TICAM-1をコードする完全長のcDNAをプラスミドベクターpEFBOSのXhoI-NoIサイトに組み込んでヒトTICAM-1発現ベクターとした。pEFBOS-TICAM-1 ($\Delta N288$)、pEFBOS-TICAM-1 ($\Delta N386$)、およびpEFBOS-TICAM-1 (TIR)は、それぞれ、Kozack配列および第1のATGの後に続いているTICAM-1の289-712番目のアミノ酸配列、387-712番目のアミノ酸配列、および387-556番目のアミノ酸配列をコードする配列をプラスミドベクターpEFBOSのXhoI-NoIサイト中に挿入することによって作製した。これらプラスミドベクターは、内毒素を含まない「Plasmid Maxi」キット (Qiagen社製) で調製した。

【0201】

〔実施例10; ヒトTICAM-1の変異による機能解析〕

ヒトTICAM-1の機能解析を行うために、ヒトTICAM-1およびその変異体について、NF- κ Bおよびインターフェロン β の活性化度を測定するリポーター遺伝子発現アッセイを行った。すなわち、インターフェロン β プロモーター等に対するTICAM-1の機能的な結合をHEK293細胞中で調べた。

【0202】

24ウェルのプレート上のHEK293細胞 (1ウェル当たり 2×10^5 個) を、遺伝子導入用カチオン性脂質「Lipofectamine 2000」試薬 (Gibco社製) を用いて、ルシフェラーゼを連結したNF- κ Bレポーター遺伝子 (Stratagene社製) $0.1 \mu\text{g}$ (図12 (b)) またはp125 lucリポータープラスミド $0.1 \mu\text{g}$ (図12 (a)) と、空ベクター、ヒトTICAM-1 TIR、ヒトTICAM-1 ($\Delta N386$)、ヒトTICAM-1 ($\Delta N288$)、または完全長のヒトTICAM-1を発現するベクター (それぞれ 10 ng)

または100 ng) とでトランスフェクトした。空ベクターを添加することによって、トランスフェクトされるDNAの総量(0.8~1.0 μ g)を調整した。また、内部コントロールとして、プラスミドベクターpCMV β (Clontech社製; 5 ng)を用いた。

【0203】

トランスフェクトの24時間後に、細胞を溶出バッファ(Promega社製)で溶出した。この溶出液について、トランスフェクト後の刺激によるNF- κ Bの活性化の度合いを表すシフェラーゼの活性を、製造業者の使用説明書に従って測定した。また、計3回の実験を行い、それらの代表値を測定値とした。インターフェロン β の活性化度を図12(a)に、NF- κ Bの活性化度を図12(b)にそれぞれ示す。

【0204】

結果として、インターフェロン β プロモーター活性化の顕著な亢進が、少量(0.1 μ g)の完全長ヒトTICAM-1を発現しているHEK293細胞において観察された(図12(a))。図12の染色体欠失分析は、ヒトTICAM-1由来のTIRドメインが、顕性不活性体として作用するMyD88のTIRとは異なり、上記機能を担っていることを示唆している。TIRドメインに対するN末端領域およびC末端領域の連結反応は、インターフェロン β プロモーターの活性化度を高めた(図12(a))。それゆえ、ヒトTICAM-1のTIRドメインは、ヒトTLR3の末端を下流の分子と結合させてインターフェロン β プロモーターを活性化するのに十分な最小の必須成分と考えられる。

【0205】

また、図12(b)に示すヒトTICAM-1によるNF- κ Bを活性化する能力を類似のトランスフェクト実験で調べた結果から、完全長のTICAM-1は、インターフェロン β プロモーターと比較して弱くNF- κ Bプロモーターを活性化することが分かった。NF- κ Bの活性化能は、TIRドメインあるいは完全長のTICAM-1を持つ細胞よりも、N末端ドメインのない変異体の方が高かった(図12)。それゆえ、N末端配列は、トランスフェクタント上でのインターフェロン β 産生に対して強い優先性を誘導し、同時にNF- κ Bの活性化

を比較的抑制すると思われる。また、C末端領域は、インターフェロン β およびNF- κ B活性化の両方を少し増強した(図12)。

【0206】

さらに、完全長のヒトTICAM-1を発現している細胞においては、TLR3のトランスフェクトなしにインターフェロン β プロモーターの活性化が誘発されることがあった(図12)。

【0207】

このことから、ヒトTICAM-1は、自発的に、インターフェロン β プロモーターを活性化し、インターフェロン β の産生を誘導すると考えられる。この自発的なインターフェロン β の産生誘導は、ヒトTICAM-1が、未知の分子とのホモ二量化あるいは錯体形成を起こすことに起因すると考えられる。この研究結果は、自動二量化する傾向があるアダプター分子Malに関する研究、および同じく自動二量化する傾向があるアダプター分子MyD88のTIRドメインの構造解析結果と整合している。

【0208】

[実施例11; TLR3によって媒介されるシグナル伝達の解析]

次に、ヒトTLR3によって媒介されるシグナル伝達を解析するためのリポーター遺伝子発現アッセイを行った。すなわち、TICAM-1の最小の必須成分であるTIRドメインをHEK293細胞に用い、インターフェロン β プロモーターの活性化に対するTLR3および/またはポリ(I:C)の効果が相加的なものであるかどうかを調べた。

【0209】

まず、ヒトTICAM-1 TIR発現ベクター(pEFBOS-TICAM-1(TIR))に対して、434番目のアミノ酸(プロリン)をヒスチジンに置換する点突然変異を挿入することによって、ヒトTICAM-1 TIRの顕性不活性な変異体を作製した。作製した変異体は、「TIR P434H」と命名した。

【0210】

24ウェルのプレート上のHEK293細胞(1ウェル当たり 2×10^5 個)

を、遺伝子導入用カチオン性脂質「Lipofectamine 2000」試薬 (Gibco社製) を用いて、ルシフェラーゼを連結したNF- κ Bレポータ遺伝子 (Stratagene社製) 0.1 μ g (図13 (b)) またはp125 lucリポータープラスミド0.1 μ g (図13 (a)) と、TICAM-1 TIR (0.1 ng および10 ng) またはTICAM-1 TIRの顕性不活性な変異体TIR P434Hをコードしているプラスミド (0, 0.2 μ g, 0.6 μ g) と、空ベクター、TLR2 (0.1 μ g)、またはTLR3 (0.1 μ g) とでトランスフェクトした。空ベクターを添加することによって、トランスフェクトされるDNAの総量 (0.8~1.0 μ g) を調整した。また、内部コントロールとして、プラスミドベクターpCMV β (Clontech社製; 5 ng) を用いた。

【0211】

トランスフェクトの24時間後に、細胞を100 nMのMALP-2 (TLR2刺激) あるいは10 μ g/mlのポリ (I:C) (TLR3刺激) で6時間刺激し、細胞を溶出バッファ (Promega社製) で溶出した。この溶出液について、トランスフェクト後の刺激によるインターフェロン β の活性またはNF- κ Bの活性を表すルシフェラーゼの活性を、製造業者の使用説明書に従って測定した。また、計3回の実験を行い、それらの代表値を測定値とした。インターフェロン β の活性化度を図13 (a) に、NF- κ Bの活性化度を図13 (b) にそれぞれ示す。

【0212】

TLR3およびTICAM-1のTIRの両方をトランスフェクトした結果、インターフェロン β プロモーターが強く活性化された (図13)。また、低い導入量のTICAM-1 TIRトランスフェクタント (図13) の結果から非常に明確に示されているように、ポリ (I:C) によるトランスフェクタントの刺激は、TICAM-1を介するインターフェロン β プロモーターの活性化を亢進した。ヒトTICAM-1を発現している細胞に対してヒトTLR3コトランスフェクションおよびポリ (I:C) 刺激を行ったことによるNF- κ B活性化の亢進がみられた (図13)。一方、ヒトTLR2を発現する細胞に対してTICAM-1による追加のトランスフェクションを行っても、ヒトTLR2刺激に

応答したNF- κ Bの活性化が起こらなかった(図13)。これらから、ヒトTICAM-1がヒトTLR3に対して特異性を有していると考えられる。また、HEK293細胞中でTICAM-1のTIRと共にTLR2を発現させたところ、ヒトTLR2のリガンドであるマイコプラズマリポペプチドMALP-2で刺激された細胞中でさえ、インターフェロン β プロモーターの発現を活性化しなかった(図13)。

【0213】

以上のことから、ヒトTICAM-1に対するヒトTLR3の機能的な会合は、ポリ(I:C)によって媒介されるインターフェロン β プロモーターの活性化に関与すると考えられる。

【0214】

また、興味深いことに、活性なTICAM-1 TIRの代わりにTICAM-1 TIRの顕性不活性な変異体P434Hをトランスフェクトした場合、ポリ(I:C)-TLR3によって媒介されるインターフェロン β プロモーターおよびNF- κ Bの活性化が完全にキャンセルされた(図13)。これは、TICAM-1 TIRの顕性不活性な変異体P434Hは、ヒトTLR3に結合する能力を持つ一方、インターフェロン β の産生を誘導する能力を失っているためと考えられる。したがって、この変異体は、むしろヒトTLR3を介するシグナル伝達を遮断してインターフェロン β の産生を阻害するものと考えられる。

【0215】

[実施例12;アダプター分子の機能解析]

次に、ヒトTICAM-1と既知のアダプター分子MyD88およびMal/TIRAPとの間でインターフェロン β およびNF- κ Bの活性化度を比較するためのリポーター遺伝子発現アッセイを行った。

【0216】

24ウェルのプレート上のHEK293細胞(1ウェル当たり 2×10^5 個)を、遺伝子導入用カチオン性脂質「Lipofectamine 2000」試薬(Gibco社製)を用いて、ルシフェラーゼを連結したNF- κ Bレポーター遺伝子(Stratagene社製) $0.1 \mu\text{g}$ (図14(b))またはp125 lucリポータ

ープラスミド $0.1 \mu\text{g}$ (図 14 (a)) と、空ベクター、MyD88、Mal/TIRAP、または完全長の TICAM-1 (それぞれ 10 、 100 、または 200 ng) とでトランスフェクトした。空ベクターを添加することによって、トランスフェクトされる DNA の総量 ($0.8 \sim 1.0 \mu\text{g}$) を調整した。また、内部コントロールとして、プラスミドベクター pCMV β (Clontech 社製; 5 ng) を用いた。

【0217】

トランスフェクトの 24 時間後に、細胞を溶出バッファ (Promega 社製) で溶出した。この溶出液について、インターフェロン β の活性または NF- κ B の活性を表すルシフェラーゼの活性を、製造業者の使用説明書に従って測定した。また、計 3 回の実験を行い、それらの代表値を測定値とした。インターフェロン β の活性化度を図 14 (a) に、NF- κ B の活性化度を図 14 (b) にそれぞれ示す。

【0218】

インターフェロン β プロモーターおよび NF- κ B の活性化プロフィールを比較 (図 14) すると、これらの 3 つのアダプター分子は、NF- κ B に対して類似レベルの活性化を誘導した (図 14) のに対し、TLR3 および/またはポリ (I:C) のようないかなる刺激もない条件において、完全長のヒト TICAM-1 によるインターフェロン β プロモーター誘発活性は、アダプター分子 Mal/TIRAP または MyD88 によるインターフェロン β プロモーター誘発活性と比較して 100 倍以上高かった (図 14)。したがって、ヒト TICAM-1 は、インターフェロン β プロモーターに対してより直接的に作用し、インターフェロン β の産生を顕著に亢進することができると考えられる。

【0219】

[実施例 13 ; ウェスタンブロット]

HEK293 細胞を、アダプター分子 Mal-HA、MyD88-HA、あるいは TICAM-1-HA をそれぞれコードするプラスミド (100 ng) で過渡的にトランスフェクトした。トランスフェクトから 24 時間後に、細胞を溶解し、発現されたタンパク質を抗 HA 抗体を用いてウェスタンブロット法により解

析した。

【0220】

得られたウエスタンブロットを図15に示す。左側の黒い矢印はM a l-HAの発現を示し、中央の白抜きの矢印はM y D 8 8-HAを示し、右側の矢印はT I C A M-1-HAの発現を示す。図15の結果から、これらのアダプター分子は、妥当なタンパク質発現レベルを持つことが確認された。

【0221】

〔実施例14；T I C A M-1ノックダウン〕

次に、T I C A M-1を介するインターフェロン β の産生誘導へのシグナル伝達を確認するために、一本鎖RNAのトランスフェクションによってヒトT I C A M-1ノックダウン細胞を生成した。

【0222】

ヒトT I C A M-1の一本鎖RNAの配列は、図16に示すように、センスが r [GACCAGACGCCACUCCAAC] d [TT] であり、アンチセンスが r [GUUGGAGUGGCGUCUGGUC] d [TT] (T I C A M-1) である。「r」および「d」はそれぞれ、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドを表す。T I C A M-1のメッセージ中における一本鎖RNA領域を、一本鎖RNA配列の下に示す。

【0223】

遺伝子をサイレントにするのに有効なヒトT I C A M-1メッセージ中における一本鎖RNAのトランスフェクションの位置は、図16に示すように、986～1008番目の塩基配列 (b p) である。

【0224】

H e L a細胞およびM R C-5細胞は、細胞表面上でT L R 3を発現し、外因的に付加的なポリ (I : C) に応答してインターフェロン β を産生した。これらは両方とも、T I C A M-1およびT L R 3のmRNAを含んでいた (データは示していない)。一本鎖RNAを上記の位置に導入した細胞内ではインターフェロン β の産生が部分的に減少していた。

【0225】

〔実施例15; RT-PCR〕

ヒトTICAM-1のプライマーまたは β -アクチンのプライマーを用いてRT-PCR分析を行った。結果を図17に示す。図17(a)はHeLa細胞であり、図17(b)はMRC-5細胞である。

【0226】

用いたヒトTICAM-1のプライマーの配列は、5' CCAGATGCAACCTCCACTGG3' (5' プライマー) および5' TGGAGGAAGGAACAGGACACC3' (3' プライマー) である。

【0227】

ヒトTICAM-1のmRNAレベルは、HeLa細胞およびMRC-5細胞中においてRNAi (RNA干渉) 法によって約80%抑制された(図17)。

【0228】

したがって、これらの実験によって、TICAM-1が、二本鎖RNAによって媒介されたTLR3の活性化とインターフェロン β の産生とをつなぐアダプター分子であるという直接的な証拠が得られた。

【0229】

〔実施例16; RNAi〕

RNAiにより二本鎖RNAの補充が、ヒトTICAM-1が減少されたHeLa細胞およびMRC-5細胞中におけるインターフェロン β タンパク質の産生を誘発するかどうかを調べた。

【0230】

HeLa細胞またはMRC-5細胞を、「Oligofectamine」(Invitrogen社; 最終濃度200nM)を用い、バッファだけ、ラミン(Lamin)A/Cの一本鎖RNA(コントロール; 最終濃度200nM)、またはヒトTICAM-1の一本鎖RNAでトランスフェクトした。トランスフェクトから48時間後に、HeLa細胞およびMRC-5細胞をそれぞれ、50 μ g/mlおよび10 μ g/mlのポリ(I:C)で刺激した。24時間の刺激の前(0時間刺激後)および24時間の刺激の後における上清のインターフェロン β の濃度をELISAで測定した。HeLa細胞の測定結果を図18(a)に、MRC-5細胞の

測定結果を図18 (b) に示す。

【0231】

RNAiの基本的な方法は、Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411: 494-498 (2001)に記載されている。また、詳細な手順および条件はOshiumi, H., Brgum, N. A., Matsumoto, M., & Seya, T. RNA interference for mammalian cells, Folia Pharme, Jpn. 120: 91-95 (2002)に記載されている。

【0232】

ヒトTICAM-1の一本鎖RNAの配列は、センスがr [GACCAGACGCCACUCCAAC] d [TT] であり、アンチセンスがr [GUUGGAGUGGCGUCUGGUC] d [TT] (TICAM-1) である。また、lamina/Cの一本鎖RNAの配列は、センスがr [CUGGACUCCA GAAGAACA] d [TT]、アンチセンスがr [UGUUCUUCUGGAAGUCCAG] d [TT] である。ここで、「r」および「d」はそれぞれ、リボヌクレオチドおよびデオキシリボヌクレオチドを表す。これらの一本鎖RNAは、Xeragon社 (USA) から購入した。

【0233】

ポリ (I : C) (10 μ g/mL または 50 μ g/mL) で刺激した細胞 (HeLa細胞またはMRC-5細胞) を24時間 (24 h) 培養し、上清を採取した。培養液の上清中におけるヒトインターフェロン β の濃度は、ELISA (酵素結合免疫吸着定量法; TEB社製) によって測定した。結果を図18に示す。

【0234】

これらの細胞中においては、インターフェロン β 産生のレベルは、一本鎖RNAによって約50%まで特異的に阻害された (図18)。

【0235】

したがって、これらの実験によって、TICAM-1が、二本鎖RNAによって媒介されたTLR3の活性化とインターフェロン β の産生とをつなぐアダプター分子であるという直接的な証拠が得られた。

【0236】

【発明の効果】

本発明は、以上のように、哺乳動物のToll様受容体3に対して特異的に結合してI型インターフェロンの産生を誘導する新規アダプタータンパク質およびその変異体、上記タンパク質の遺伝子、上記遺伝子を含む組換え発現ベクター、上記タンパク質に対する抗体を提供できる。

【0237】

これらは、〔発明の実施の形態〕の欄で詳述したように、上記TLR3を介したシグナル伝達系ならびにその調節機構を研究解析するための研究材料、当該シグナル伝達系やその調節機構に関わる種々の病気の病態解析、B型肝炎やC型肝炎等のウイルス感染症の予防・治療、腫瘍の治療、自己免疫疾患の治療、アレルギー疾患の治療等に有用である。

【0238】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Novel Apaptor Protein capable of binding Mammal Toll-Like Rceptor
3

<130> A211P06

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2460

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (63)..(2198)

<400> 1

gtgtggaaca tgccttcacc acctccagct tctgctgccg gaggctgcac ccacctgtgc 60

cc atg gcc tgc aca ggc cca tca ctt cct agc gcc ttc gac att cta 107

Met Ala Cys Thr Gly Pro Ser Leu Pro Ser Ala Phe Asp Ile Leu

1

5

10

15

ggt gca gca ggc cag gac aag ctc ttg tat ctg aag cac aaa ctg aag 155

Gly Ala Ala Gly Gln Asp Lys Leu Leu Tyr Leu Lys His Lys Leu Lys

20

25

30

acc cca cgc cca ggc tgc cag ggg cag gac ctc ctg cat gcc atg gtt 203

Thr Pro Arg Pro Gly Cys Gln Gly Gln Asp Leu Leu His Ala Met Val

35

40

45

ctc ctg aag ctg ggc cag gaa act gag gcc agg atc tct cta gag gca 251

Leu Leu Lys Leu Gly Gln Glu Thr Glu Ala Arg Ile Ser Leu Glu Ala

50

55

60

ttg aag gcc gat gcg gtg gcc cgg ctg gtg gcc cgc cag tgg gct ggc 299

Leu Lys Ala Asp Ala Val Ala Arg Leu Val Ala Arg Gln Trp Ala Gly

65

70

75

gtg gac agc acc gag gac cca gag gag ccc cca gat gtg tcc tgg gct 347
Val Asp Ser Thr Glu Asp Pro Glu Glu Pro Pro Asp Val Ser Trp Ala
80 85 90 95

gtg gcc cgc ttg tac cac ctg ctg gct gag gag aag ctg tgc ccc gcc 395
Val Ala Arg Leu Tyr His Leu Leu Ala Glu Glu Lys Leu Cys Pro Ala
100 105 110

tcg ctg cgg gac gtg gcc tac cag gaa gcc gtc cgc acc ctc agc tcc 443
Ser Leu Arg Asp Val Ala Tyr Gln Glu Ala Val Arg Thr Leu Ser Ser
115 120 125

agg gac gac cac cgg ctg ggg gaa ctt cag gat gag gcc cga aac cgg 491
Arg Asp Asp His Arg Leu Gly Glu Leu Gln Asp Glu Ala Arg Asn Arg
130 135 140

tgt ggg tgg gac att gct ggg gat cca ggg agc atc cgg acg ctc cag 539
Cys Gly Trp Asp Ile Ala Gly Asp Pro Gly Ser Ile Arg Thr Leu Gln
145 150 155

tcc aat ctg ggc tgc ctc cca cca tcc tcg gct ttg ccc tct ggg acc 587
Ser Asn Leu Gly Cys Leu Pro Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Gly Thr
160 165 170 175

agg agc ctc cca cgc ccc att gac ggt gtt tcg gac tgg agc caa ggg 635
Arg Ser Leu Pro Arg Pro Ile Asp Gly Val Ser Asp Trp Ser Gln Gly
180 185 190

tgc tcc ctg cga tcc act ggc agc cct gcc tcc ctg gcc agc aac ttg 683
Cys Ser Leu Arg Ser Thr Gly Ser Pro Ala Ser Leu Ala Ser Asn Leu
195 200 205

gaa atc agc cag tcc cct acc atg ccc ttc ctc agc ctg cac cgc agc 731
Glu Ile Ser Gln Ser Pro Thr Met Pro Phe Leu Ser Leu His Arg Ser
210 215 220

cca cat ggg ccc agc aag ctc tgt gac gac ccc cag gcc agc ttg gtg 779
Pro His Gly Pro Ser Lys Leu Cys Asp Asp Pro Gln Ala Ser Leu Val
225 230 235

ccc gag cct gtc ccc ggt ggc tgc cag gag cct gag gag atg agc tgg 827
Pro Glu Pro Val Pro Gly Gly Cys Gln Glu Pro Glu Glu Met Ser Trp
240 245 250 255

ccg cca tcg ggg gag att gcc agc cca cca gag ctg cca agc agc cca 875
Pro Pro Ser Gly Glu Ile Ala Ser Pro Pro Glu Leu Pro Ser Ser Pro
260 265 270

cct cct ggg ctt ccc gaa gtg gcc cca gat gca acc tcc act ggc ctc 923
Pro Pro Gly Leu Pro Glu Val Ala Pro Asp Ala Thr Ser Thr Gly Leu
275 280 285

cct gat acc ccc gca gct cca gaa acc agc acc aac tac cca gtg gag 971
Pro Asp Thr Pro Ala Ala Pro Glu Thr Ser Thr Asn Tyr Pro Val Glu
290 295 300

tgc acc gag ggg tct gca ggc ccc cag tct ctc ccc ttg cct att ctg 1019
Cys Thr Glu Gly Ser Ala Gly Pro Gln Ser Leu Pro Leu Pro Ile Leu
305 310 315

gag ccg gtc aaa aac ccc tgc tct gtc aaa gac cag acg cca ctc caa 1067
Glu Pro Val Lys Asn Pro Cys Ser Val Lys Asp Gln Thr Pro Leu Gln
320 325 330 335

ctt tct gta gaa gat acc acc tct cca aat acc aag ccg tgc cca cct 1115
Leu Ser Val Glu Asp Thr Thr Ser Pro Asn Thr Lys Pro Cys Pro Pro
340 345 350

act ccc acc acc cca gaa aca tcc cct cct cct cct cct cct cct cct 1163
Thr Pro Thr Thr Pro Glu Thr Ser Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
355 360 365

tca tct act cct tgt tca gct cac ctg acc ccc tcc tcc ctg ttc cct 1211
Ser Ser Thr Pro Cys Ser Ala His Leu Thr Pro Ser Ser Leu Phe Pro
370 375 380

tcc tcc ctg gaa tca tca tcg gaa cag aaa ttc tat aac ttt gtg atc 1259
Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ser Glu Gln Lys Phe Tyr Asn Phe Val Ile
385 390 395

ctc cac gcc agg gca gac gaa cac atc gcc ctg cgg gtt cgg gag aag 1307
Leu His Ala Arg Ala Asp Glu His Ile Ala Leu Arg Val Arg Glu Lys
400 405 410 415

ctg gag gcc ctt ggc gtg ccc gac ggg gcc acc ttc tgc gag gat ttc 1355

Leu Glu Ala Leu Gly Val Pro Asp Gly Ala Thr Phe Cys Glu Asp Phe
 420 425 430

cag gtg ccg ggg cgc ggg gag ctg agc tgc ctg cag gac gcc ata gac 1403
 Gln Val Pro Gly Arg Gly Glu Leu Ser Cys Leu Gln Asp Ala Ile Asp
 435 440 445

cac tca gct ttc atc atc cta ctt ctc acc tcc aac ttc gac tgt cgc 1451
 His Ser Ala Phe Ile Ile Leu Leu Leu Thr Ser Asn Phe Asp Cys Arg
 450 455 460

ctg agc ctg cac cag gtg aac caa gcc atg atg agc aac ctc acg cga 1499
 Leu Ser Leu His Gln Val Asn Gln Ala Met Met Ser Asn Leu Thr Arg
 465 470 475

cag ggg tcg cca gac tgt gtc atc ccc ttc ctg ccc ctg gag agc tcc 1547
 Gln Gly Ser Pro Asp Cys Val Ile Pro Phe Leu Pro Leu Glu Ser Ser
 480 485 490 495

ccg gcc cag ctc agc tcc gac acg gcc agc ctg ctc tcc ggg ctg gtg 1595
 Pro Ala Gln Leu Ser Ser Asp Thr Ala Ser Leu Leu Ser Gly Leu Val
 500 505 510

cgg ctg gac gaa cac tcc cag atc ttc gcc agg aag gtg gcc aac acc 1643
 Arg Leu Asp Glu His Ser Gln Ile Phe Ala Arg Lys Val Ala Asn Thr
 515 520 525

ttc aag ccc cac agg ctt cag gcc cga aag gcc atg tgg agg aag gaa 1691
 Phe Lys Pro His Arg Leu Gln Ala Arg Lys Ala Met Trp Arg Lys Glu

530

535

540

cag gac acc cga gcc ctg cgg gaa cag agc caa cac ctg gac ggt gag 1739

Gln Asp Thr Arg Ala Leu Arg Glu Gln Ser Gln His Leu Asp Gly Glu

545

550

555

cgg atg cag gcg gcg gca ctg aac gca gcc tac tca gcc tac ctc cag 1787

Arg Met Gln Ala Ala Ala Leu Asn Ala Ala Tyr Ser Ala Tyr Leu Gln

560

565

570

575

agc tac ttg tcc tac cag gca cag atg gag cag ctc cag gtg gct ttt 1835

Ser Tyr Leu Ser Tyr Gln Ala Gln Met Glu Gln Leu Gln Val Ala Phe

580

585

590

ggg agc cac atg tca ttt ggg act ggg gcg ccc tat ggg gct cga atg 1883

Gly Ser His Met Ser Phe Gly Thr Gly Ala Pro Tyr Gly Ala Arg Met

595

600

605

ccc ttt ggg ggc cag gtg ccc ctg gga gcc ccg cca ccc ttt ccc act 1931

Pro Phe Gly Gly Gln Val Pro Leu Gly Ala Pro Pro Pro Phe Pro Thr

610

615

620

tgg ccg ggg tgc ccg cag ccg cca ccc ctg cac gca tgg cag gct ggc 1979

Trp Pro Gly Cys Pro Gln Pro Pro Pro Leu His Ala Trp Gln Ala Gly

625

630

635

acc ccc cca ccg ccc tcc cca cag cca gca gcc ttt cca cag tca ctg 2027

Thr Pro Pro Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Ala Phe Pro Gln Ser Leu

640

645

650

655

ccc ttc ccg cag tcc cca gcc ttc cct acg gcc tca ccc gca ccc cct 2075
Pro Phe Pro Gln Ser Pro Ala Phe Pro Thr Ala Ser Pro Ala Pro Pro

660

665

670

cag agc cca ggg ctg caa ccc ctc att atc cac cac gca cag atg gta 2123
Gln Ser Pro Gly Leu Gln Pro Leu Ile Ile His His Ala Gln Met Val

675

680

685

cag ctg ggg ctg aac aac cac atg tgg aac cag aga ggg tcc cag gcg 2171
Gln Leu Gly Leu Asn Asn His Met Trp Asn Gln Arg Gly Ser Gln Ala

690

695

700

ccc gag gac aag acg cag gag gca gaa tgaccgcgtg tccttgccctg 2218
Pro Glu Asp Lys Thr Gln Glu Ala Glu

705

710

accacctggg gaacacccct ggaccaggc atcgccagg accccataga gcaccccggt 2278

ctgccctgtg ccctgtggac agtgggaagat gaggtcatct gccactttca ggacattgtc 2338

cgggagccct tcatttagga caaacgggc gcgatgatgc cctggctttc aggggtgtgca 2398

gaactggata cgggtgttac aattccaatc tctctatttc tgggtgaagg gtcttggtgg 2458

tg

2460

<210> 2

<211> 712

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Cys Thr Gly Pro Ser Leu Pro Ser Ala Phe Asp Ile Leu Gly

1

5

10

15

Ala Ala Gly Gln Asp Lys Leu Leu Tyr Leu Lys His Lys Leu Lys Thr

20

25

30

Pro Arg Pro Gly Cys Gln Gly Gln Asp Leu Leu His Ala Met Val Leu

35

40

45

Leu Lys Leu Gly Gln Glu Thr Glu Ala Arg Ile Ser Leu Glu Ala Leu

50

55

60

Lys Ala Asp Ala Val Ala Arg Leu Val Ala Arg Gln Trp Ala Gly Val

65

70

75

80

Asp Ser Thr Glu Asp Pro Glu Glu Pro Pro Asp Val Ser Trp Ala Val

85

90

95

Ala Arg Leu Tyr His Leu Leu Ala Glu Glu Lys Leu Cys Pro Ala Ser

100

105

110

Leu Arg Asp Val Ala Tyr Gln Glu Ala Val Arg Thr Leu Ser Ser Arg

115

120

125

Asp Asp His Arg Leu Gly Glu Leu Gln Asp Glu Ala Arg Asn Arg Cys
130 135 140

Gly Trp Asp Ile Ala Gly Asp Pro Gly Ser Ile Arg Thr Leu Gln Ser
145 150 155 160

Asn Leu Gly Cys Leu Pro Pro Ser Ser Ala Leu Pro Ser Gly Thr Arg
165 170 175

Ser Leu Pro Arg Pro Ile Asp Gly Val Ser Asp Trp Ser Gln Gly Cys
180 185 190

Ser Leu Arg Ser Thr Gly Ser Pro Ala Ser Leu Ala Ser Asn Leu Glu
195 200 205

Ile Ser Gln Ser Pro Thr Met Pro Phe Leu Ser Leu His Arg Ser Pro
210 215 220

His Gly Pro Ser Lys Leu Cys Asp Asp Pro Gln Ala Ser Leu Val Pro
225 230 235 240

Glu Pro Val Pro Gly Gly Cys Gln Glu Pro Glu Glu Met Ser Trp Pro
245 250 255

Pro Ser Gly Glu Ile Ala Ser Pro Pro Glu Leu Pro Ser Ser Pro Pro
260 265 270

Pro Gly Leu Pro Glu Val Ala Pro Asp Ala Thr Ser Thr Gly Leu Pro
275 280 285

Asp Thr Pro Ala Ala Pro Glu Thr Ser Thr Asn Tyr Pro Val Glu Cys
290 295 300

Thr Glu Gly Ser Ala Gly Pro Gln Ser Leu Pro Leu Pro Ile Leu Glu
305 310 315 320

Pro Val Lys Asn Pro Cys Ser Val Lys Asp Gln Thr Pro Leu Gln Leu
325 330 335

Ser Val Glu Asp Thr Thr Ser Pro Asn Thr Lys Pro Cys Pro Pro Thr
340 345 350

Pro Thr Thr Pro Glu Thr Ser Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser
355 360 365

Ser Thr Pro Cys Ser Ala His Leu Thr Pro Ser Ser Leu Phe Pro Ser
370 375 380

Ser Leu Glu Ser Ser Ser Glu Gln Lys Phe Tyr Asn Phe Val Ile Leu
385 390 395 400

His Ala Arg Ala Asp Glu His Ile Ala Leu Arg Val Arg Glu Lys Leu
405 410 415

Glu Ala Leu Gly Val Pro Asp Gly Ala Thr Phe Cys Glu Asp Phe Gln
420 425 430

Val Pro Gly Arg Gly Glu Leu Ser Cys Leu Gln Asp Ala Ile Asp His

435

440

445

Ser Ala Phe Ile Ile Leu Leu Leu Thr Ser Asn Phe Asp Cys Arg Leu

450

455

460

Ser Leu His Gln Val Asn Gln Ala Met Met Ser Asn Leu Thr Arg Gln

465

470

475

480

Gly Ser Pro Asp Cys Val Ile Pro Phe Leu Pro Leu Glu Ser Ser Pro

485

490

495

Ala Gln Leu Ser Ser Asp Thr Ala Ser Leu Leu Ser Gly Leu Val Arg

500

505

510

Leu Asp Glu His Ser Gln Ile Phe Ala Arg Lys Val Ala Asn Thr Phe

515

520

525

Lys Pro His Arg Leu Gln Ala Arg Lys Ala Met Trp Arg Lys Glu Gln

530

535

540

Asp Thr Arg Ala Leu Arg Glu Gln Ser Gln His Leu Asp Gly Glu Arg

545

550

555

560

Met Gln Ala Ala Ala Leu Asn Ala Ala Tyr Ser Ala Tyr Leu Gln Ser

565

570

575

Tyr Leu Ser Tyr Gln Ala Gln Met Glu Gln Leu Gln Val Ala Phe Gly

580

585

590

Ser His Met Ser Phe Gly Thr Gly Ala Pro Tyr Gly Ala Arg Met Pro
595 600 605

Phe Gly Gly Gln Val Pro Leu Gly Ala Pro Pro Pro Phe Pro Thr Trp
610 615 620

Pro Gly Cys Pro Gln Pro Pro Pro Leu His Ala Trp Gln Ala Gly Thr
625 630 635 640

Pro Pro Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Ala Phe Pro Gln Ser Leu Pro
645 650 655

Phe Pro Gln Ser Pro Ala Phe Pro Thr Ala Ser Pro Ala Pro Pro Gln
660 665 670

Ser Pro Gly Leu Gln Pro Leu Ile Ile His His Ala Gln Met Val Gln
675 680 685

Leu Gly Leu Asn Asn His Met Trp Asn Gln Arg Gly Ser Gln Ala Pro
690 695 700

Glu Asp Lys Thr Gln Glu Ala Glu
705 710

<210> 3

<211> 2299

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (66)..(2261)

<400> 3

tcggttcgga acatgtctcc acccacccca ccctctgtgg ctccaggctt cattctcccc 60

catcc atg gat aac cca ggg cct tcg ctc cgt ggt gcc ttt ggc att cta 110

Met Asp Asn Pro Gly Pro Ser Leu Arg Gly Ala Phe Gly Ile Leu

1 5 10 15

ggt gcc ttg gaa agg gac agg ctg acc cac ctg aaa cac aag ctg ggg 158

Gly Ala Leu Glu Arg Asp Arg Leu Thr His Leu Lys His Lys Leu Gly

20 25 30

agt ctg tgt tca ggc agc cag gag tca aag ctt ctc cat gcc atg gta 206

Ser Leu Cys Ser Gly Ser Gln Glu Ser Lys Leu Leu His Ala Met Val

35 40 45

ctc ctg gct ctg ggc cag gac acg gag gcc agg gtc tct ctg gag tcc 254

Leu Leu Ala Leu Gly Gln Asp Thr Glu Ala Arg Val Ser Leu Glu Ser

50 55 60

ttg aag atg aac aca gta gcc cag ctg gta gcc cac cag tgg gca gac 302

Leu Lys Met Asn Thr Val Ala Gln Leu Val Ala His Gln Trp Ala Asp

65 70 75

atg gag acc aca gag ggc cct gag gag cct cca gac ttg tcc tgg acg 350
Met Glu Thr Thr Glu Gly Pro Glu Glu Pro Pro Asp Leu Ser Trp Thr
80 85 90 95

gtg gct cgc ctg tac cac ctg ctg gct gag gag aac ctg tgt ccg gcc 398
Val Ala Arg Leu Tyr His Leu Leu Ala Glu Glu Asn Leu Cys Pro Ala
100 105 110

tcc aca agg gac atg gct tac cag gtg gcc ctt cgt gac ttt gcc tcc 446
Ser Thr Arg Asp Met Ala Tyr Gln Val Ala Leu Arg Asp Phe Ala Ser
115 120 125

cag ggt gac cac cag ctg ggc caa ctc cag aat gag gcc tgg gat cgg 494
Gln Gly Asp His Gln Leu Gly Gln Leu Gln Asn Glu Ala Trp Asp Arg
130 135 140

tgc agt tca gat atc aag ggg gac ccc agt ggt ttc cag cca ctc cat 542
Cys Ser Ser Asp Ile Lys Gly Asp Pro Ser Gly Phe Gln Pro Leu His
145 150 155

tct cat cag ggt tcc ctg cag cca cct tca gca tcc cct gca gtg acc 590
Ser His Gln Gly Ser Leu Gln Pro Pro Ser Ala Ser Pro Ala Val Thr
160 165 170 175

aga agc cag cct cgt ccc att gac aca cca gac tgg agt tgg gga cat 638
Arg Ser Gln Pro Arg Pro Ile Asp Thr Pro Asp Trp Ser Trp Gly His
180 185 190

acg tta cac tcc acc aac agc act gcc tca ctg gcc agc cac cta gag 686

Thr Leu His Ser Thr Asn Ser Thr Ala Ser Leu Ala Ser His Leu Glu
 195 200 205

atc agc cag tca ccc act ctt gcc ttt ctc tct tca cac cat gga acc 734
 Ile Ser Gln Ser Pro Thr Leu Ala Phe Leu Ser Ser His His Gly Thr
 210 215 220

cat ggg ccc agc aag cta tgt aac aca ccg ctg gac act cag gag cct 782
 His Gly Pro Ser Lys Leu Cys Asn Thr Pro Leu Asp Thr Gln Glu Pro
 225 230 235

cag ctt gtc cct gaa ggc tgc caa gaa cct gag gag ata agc tgg cct 830
 Gln Leu Val Pro Glu Gly Cys Gln Glu Pro Glu Glu Ile Ser Trp Pro
 240 245 250 255

cca tca gtg gag acc agt gtc tcc tta ggg tta cca cac gaa att agc 878
 Pro Ser Val Glu Thr Ser Val Ser Leu Gly Leu Pro His Glu Ile Ser
 260 265 270

gtt cca gag gtg tct cca gag gag gct tcg ccc atc ctc cct gac gcc 926
 Val Pro Glu Val Ser Pro Glu Glu Ala Ser Pro Ile Leu Pro Asp Ala
 275 280 285

ctg gct gct cca gac aca agt gtc cac tgt ccc att gaa tgc aca gag 974
 Leu Ala Ala Pro Asp Thr Ser Val His Cys Pro Ile Glu Cys Thr Glu
 290 295 300

ttg tct aca aac tcc agg tct ccc ctg acg tcc acc aca gaa agt gtt 1022
 Leu Ser Thr Asn Ser Arg Ser Pro Leu Thr Ser Thr Thr Glu Ser Val

305

310

315

gga aag cag tgg cct att aca agt cag agg tca cct cag gtt cct gta 1070
Gly Lys Gln Trp Pro Ile Thr Ser Gln Arg Ser Pro Gln Val Pro Val
320 325 330 335

gga gat gat tct ctg cag aac acc acg tca tcc agc cct cct gcc cag 1118
Gly Asp Asp Ser Leu Gln Asn Thr Thr Ser Ser Ser Pro Pro Ala Gln
340 345 350

cca cca tcc ctc caa gcc tcc cct aag ctg cct cct tcc cct ctg tcc 1166
Pro Pro Ser Leu Gln Ala Ser Pro Lys Leu Pro Pro Ser Pro Leu Ser
355 360 365

tct gct tcc tcc ccg agc agc tac cct gct cct cca acc tcc aca tcc 1214
Ser Ala Ser Ser Pro Ser Ser Tyr Pro Ala Pro Pro Thr Ser Thr Ser
370 375 380

cct gtt ttg gac cac tca gaa aca tct gat cag aaa ttc tat aac ttt 1262
Pro Val Leu Asp His Ser Glu Thr Ser Asp Gln Lys Phe Tyr Asn Phe
385 390 395

gtg gtt atc cat gcc agg gct gat gaa cag gtg gcc cta cgt att cgg 1310
Val Val Ile His Ala Arg Ala Asp Glu Gln Val Ala Leu Arg Ile Arg
400 405 410 415

gag aag ctg gag acc ctc ggg gta cct gac ggg gcc acc ttc tgt gag 1358
Glu Lys Leu Glu Thr Leu Gly Val Pro Asp Gly Ala Thr Phe Cys Glu
420 425 430

gaa ttt cag gtg ccc ggg cgt ggt gag ctg cac tgt ctc caa gat gcc 1406

Glu Phe Gln Val Pro Gly Arg Gly Glu Leu His Cys Leu Gln Asp Ala

435

440

445

atc gat cac tcg ggg ttc acg atc ctg ctc ctg act gct agc ttt gat 1454

Ile Asp His Ser Gly Phe Thr Ile Leu Leu Leu Thr Ala Ser Phe Asp

450

455

460

tgc agc ctg agc ctg cat caa atc aac cat gct ctc atg aac agc ctt 1502

Cys Ser Leu Ser Leu His Gln Ile Asn His Ala Leu Met Asn Ser Leu

465

470

475

aca cag tct ggg agg cag gac tgt gtg atc ccc ctc ctc cca ctt gag 1550

Thr Gln Ser Gly Arg Gln Asp Cys Val Ile Pro Leu Leu Pro Leu Glu

480

485

490

495

tgt tct cag gcc cag ctc agc cca gat aca acc aga ctg ctc cac agc 1598

Cys Ser Gln Ala Gln Leu Ser Pro Asp Thr Thr Arg Leu Leu His Ser

500

505

510

att gtg tgg ctg gat gaa cac tcc cca atc ttc gcc aga aag gtg gca 1646

Ile Val Trp Leu Asp Glu His Ser Pro Ile Phe Ala Arg Lys Val Ala

515

520

525

aac acc ttc aag aca cag aag ctc cag gca cag cgg gta cgc tgg aag 1694

Asn Thr Phe Lys Thr Gln Lys Leu Gln Ala Gln Arg Val Arg Trp Lys

530

535

540

aaa gcg cag gag gcc aga acc ctc aag gag cag agc ata cag ctg gag 1742
Lys Ala Gln Glu Ala Arg Thr Leu Lys Glu Gln Ser Ile Gln Leu Glu
545 550 555

gca gag cgg caa aac gtg gca gcc ata tct gct gcc tac aca gcc tat 1790
Ala Glu Arg Gln Asn Val Ala Ala Ile Ser Ala Ala Tyr Thr Ala Tyr
560 565 570 575

gtc cat agc tat agg gcc tgg caa gca gag atg aac aaa ctt ggg gtg 1838
Val His Ser Tyr Arg Ala Trp Gln Ala Glu Met Asn Lys Leu Gly Val
580 585 590

gct ttt ggg aag aac ttg tca ctg ggg act cca aca ccc agc tgg ccc 1886
Ala Phe Gly Lys Asn Leu Ser Leu Gly Thr Pro Thr Pro Ser Trp Pro
595 600 605

gga tgt cca cag cca ata cct tct cat cct cag ggt ggt act cca gtt 1934
Gly Cys Pro Gln Pro Ile Pro Ser His Pro Gln Gly Gly Thr Pro Val
610 615 620

ttc ccc tat tcc cca cag cct cca tcc ttc cct cag cct cca tgc ttc 1982
Phe Pro Tyr Ser Pro Gln Pro Pro Ser Phe Pro Gln Pro Pro Cys Phe
625 630 635

cct cag cct cca tcc ttc cct cag cct cca tcc ttc cca ctg cct cca 2030
Pro Gln Pro Pro Ser Phe Pro Gln Pro Pro Ser Phe Pro Leu Pro Pro
640 645 650 655

gtc tct tcc cca cag tcc caa tcc ttt cca tca gcc tcc tcc cca gcc 2078

Val Ser Ser Pro Gln Ser Gln Ser Phe Pro Ser Ala Ser Ser Pro Ala
660 665 670

cca cag act cca gga cct cag cct ctc att att cac cat gcc cag atg 2126
Pro Gln Thr Pro Gly Pro Gln Pro Leu Ile Ile His His Ala Gln Met
675 680 685

gtt cag ctg ggt gtc aac aat cac atg tgg ggc cac aca ggg gcc cag 2174
Val Gln Leu Gly Val Asn Asn His Met Trp Gly His Thr Gly Ala Gln
690 695 700

tca tct gat gac aag act gag tgt tcg gag aac ccc tgt atg ggc cct 2222
Ser Ser Asp Asp Lys Thr Glu Cys Ser Glu Asn Pro Cys Met Gly Pro
705 710 715

ctg act gat cag ggc gaa ccc ctt ctt gag act cca gag tgaccaggtt 2271
Leu Thr Asp Gln Gly Glu Pro Leu Leu Glu Thr Pro Glu
720 725 730

ggacccacc tagatggcta gagtgaca 2299

<210> 4

<211> 732

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Asp Asn Pro Gly Pro Ser Leu Arg Gly Ala Phe Gly Ile Leu Gly

1

5

10

15

Ala Leu Glu Arg Asp Arg Leu Thr His Leu Lys His Lys Leu Gly Ser

20

25

30

Leu Cys Ser Gly Ser Gln Glu Ser Lys Leu Leu His Ala Met Val Leu

35

40

45

Leu Ala Leu Gly Gln Asp Thr Glu Ala Arg Val Ser Leu Glu Ser Leu

50

55

60

Lys Met Asn Thr Val Ala Gln Leu Val Ala His Gln Trp Ala Asp Met

65

70

75

80

Glu Thr Thr Glu Gly Pro Glu Glu Pro Pro Asp Leu Ser Trp Thr Val

85

90

95

Ala Arg Leu Tyr His Leu Leu Ala Glu Glu Asn Leu Cys Pro Ala Ser

100

105

110

Thr Arg Asp Met Ala Tyr Gln Val Ala Leu Arg Asp Phe Ala Ser Gln

115

120

125

Gly Asp His Gln Leu Gly Gln Leu Gln Asn Glu Ala Trp Asp Arg Cys

130

135

140

Ser Ser Asp Ile Lys Gly Asp Pro Ser Gly Phe Gln Pro Leu His Ser

145

150

155

160

His Gln Gly Ser Leu Gln Pro Pro Ser Ala Ser Pro Ala Val Thr Arg
165 170 175

Ser Gln Pro Arg Pro Ile Asp Thr Pro Asp Trp Ser Trp Gly His Thr
180 185 190

Leu His Ser Thr Asn Ser Thr Ala Ser Leu Ala Ser His Leu Glu Ile
195 200 205

Ser Gln Ser Pro Thr Leu Ala Phe Leu Ser Ser His His Gly Thr His
210 215 220

Gly Pro Ser Lys Leu Cys Asn Thr Pro Leu Asp Thr Gln Glu Pro Gln
225 230 235 240

Leu Val Pro Glu Gly Cys Gln Glu Pro Glu Glu Ile Ser Trp Pro Pro
245 250 255

Ser Val Glu Thr Ser Val Ser Leu Gly Leu Pro His Glu Ile Ser Val
260 265 270

Pro Glu Val Ser Pro Glu Glu Ala Ser Pro Ile Leu Pro Asp Ala Leu
275 280 285

Ala Ala Pro Asp Thr Ser Val His Cys Pro Ile Glu Cys Thr Glu Leu
290 295 300

Ser Thr Asn Ser Arg Ser Pro Leu Thr Ser Thr Thr Glu Ser Val Gly
305 310 315 320

Lys Gln Trp Pro Ile Thr Ser Gln Arg Ser Pro Gln Val Pro Val Gly
325 330 335

Asp Asp Ser Leu Gln Asn Thr Thr Ser Ser Ser Pro Pro Ala Gln Pro
340 345 350

Pro Ser Leu Gln Ala Ser Pro Lys Leu Pro Pro Ser Pro Leu Ser Ser
355 360 365

Ala Ser Ser Pro Ser Ser Tyr Pro Ala Pro Pro Thr Ser Thr Ser Pro
370 375 380

Val Leu Asp His Ser Glu Thr Ser Asp Gln Lys Phe Tyr Asn Phe Val
385 390 395 400

Val Ile His Ala Arg Ala Asp Glu Gln Val Ala Leu Arg Ile Arg Glu
405 410 415

Lys Leu Glu Thr Leu Gly Val Pro Asp Gly Ala Thr Phe Cys Glu Glu
420 425 430

Phe Gln Val Pro Gly Arg Gly Glu Leu His Cys Leu Gln Asp Ala Ile
435 440 445

Asp His Ser Gly Phe Thr Ile Leu Leu Leu Thr Ala Ser Phe Asp Cys
450 455 460

Ser Leu Ser Leu His Gln Ile Asn His Ala Leu Met Asn Ser Leu Thr

465 470 475 480

Gln Ser Gly Arg Gln Asp Cys Val Ile Pro Leu Leu Pro Leu Glu Cys
485 490 495

Ser Gln Ala Gln Leu Ser Pro Asp Thr Thr Arg Leu Leu His Ser Ile
500 505 510

Val Trp Leu Asp Glu His Ser Pro Ile Phe Ala Arg Lys Val Ala Asn
515 520 525

Thr Phe Lys Thr Gln Lys Leu Gln Ala Gln Arg Val Arg Trp Lys Lys
530 535 540

Ala Gln Glu Ala Arg Thr Leu Lys Glu Gln Ser Ile Gln Leu Glu Ala
545 550 555 560

Glu Arg Gln Asn Val Ala Ala Ile Ser Ala Ala Tyr Thr Ala Tyr Val
565 570 575

His Ser Tyr Arg Ala Trp Gln Ala Glu Met Asn Lys Leu Gly Val Ala
580 585 590

Phe Gly Lys Asn Leu Ser Leu Gly Thr Pro Thr Pro Ser Trp Pro Gly
595 600 605

Cys Pro Gln Pro Ile Pro Ser His Pro Gln Gly Gly Thr Pro Val Phe
610 615 620

Pro Tyr Ser Pro Gln Pro Pro Ser Phe Pro Gln Pro Pro Cys Phe Pro
625 630 635 640

Gln Pro Pro Ser Phe Pro Gln Pro Pro Ser Phe Pro Leu Pro Pro Val
645 650 655

Ser Ser Pro Gln Ser Gln Ser Phe Pro Ser Ala Ser Ser Pro Ala Pro
660 665 670

Gln Thr Pro Gly Pro Gln Pro Leu Ile Ile His His Ala Gln Met Val
675 680 685

Gln Leu Gly Val Asn Asn His Met Trp Gly His Thr Gly Ala Gln Ser
690 695 700

Ser Asp Asp Lys Thr Glu Cys Ser Glu Asn Pro Cys Met Gly Pro Leu
705 710 715 720

Thr Asp Gln Gly Glu Pro Leu Leu Glu Thr Pro Glu
725 730

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ヒト TLR による NF- κ B の活性化をリポーター遺伝子発現アッセイにより解析した結果を示す図である。

【図 2】

ヒト TLR によるインターフェロン β プロモーターの活性化をリポーター遺伝子発現アッセイにより解析した結果を示す図である。

【図 3】

ヒト TLR 3 およびその変異体による NF- κ B およびインターフェロン β プ

ロモーターの活性化をリポーター遺伝子発現アッセイにより解析した結果を示す図である。

【図 4】

酵母ツー・ハイブリッド・システムによるタンパク間の相互作用を調べた結果を示す図である。

【図 5】

ヒト TICAM-1 とマウス TICAM-1 との相同性検索の結果を示す図である。

【図 6】

ヒト TICAM-1 およびマウス TICAM-1 と、既知のアダプター分子 Mal および MyD88 の TIR ドメインを示す図である。

【図 7】

ヒトの多数の組織中における TICAM-1 の mRNA の発現を示すノーザンブロットである。

【図 8】

RT-PCR により複数種のヒト細胞およびヒト細胞株における TICAM-1 の mRNA を検出した結果を示す図である。

【図 9】

ヒト TICAM-1 とヒト TLR3 の相互作用を解析するための免疫沈降法の結果を示す図である。

【図 10】

ヒト TICAM-1 と、ヒト TLR3 以外のヒト TLR やヒト TLR3 変異体との相互作用を解析するための免疫沈降法の結果を示す図である。

【図 11】

ヒト TICAM-1 の変異体を示す図である。

【図 12】

ヒト TICAM-1 およびその変異体について、NF- κ B 活性およびインターフェロン β プロモーター活性の測定結果を示す図である。

【図 13】

TLR3によって媒介されるシグナル伝達を解析するためのリポーター遺伝子発現アッセイによるNF- κ B活性およびインターフェロン β 活性の測定結果を示す図である。

【図14】

ヒトTICAM-1および既知のアダプター分子についてインターフェロン β 活性およびNF- κ B活性を測定した結果を示す図である。
比較するためのリポーター遺伝子発現アッセイを行った。

【図15】

HEK293細胞中におけるヒトTICAM-1および既知のアダプター分子の発現を示すウエスタンブロットである。

【図16】

ヒトTICAM-1の一本鎖RNAの配列を示す図である。

【図17】

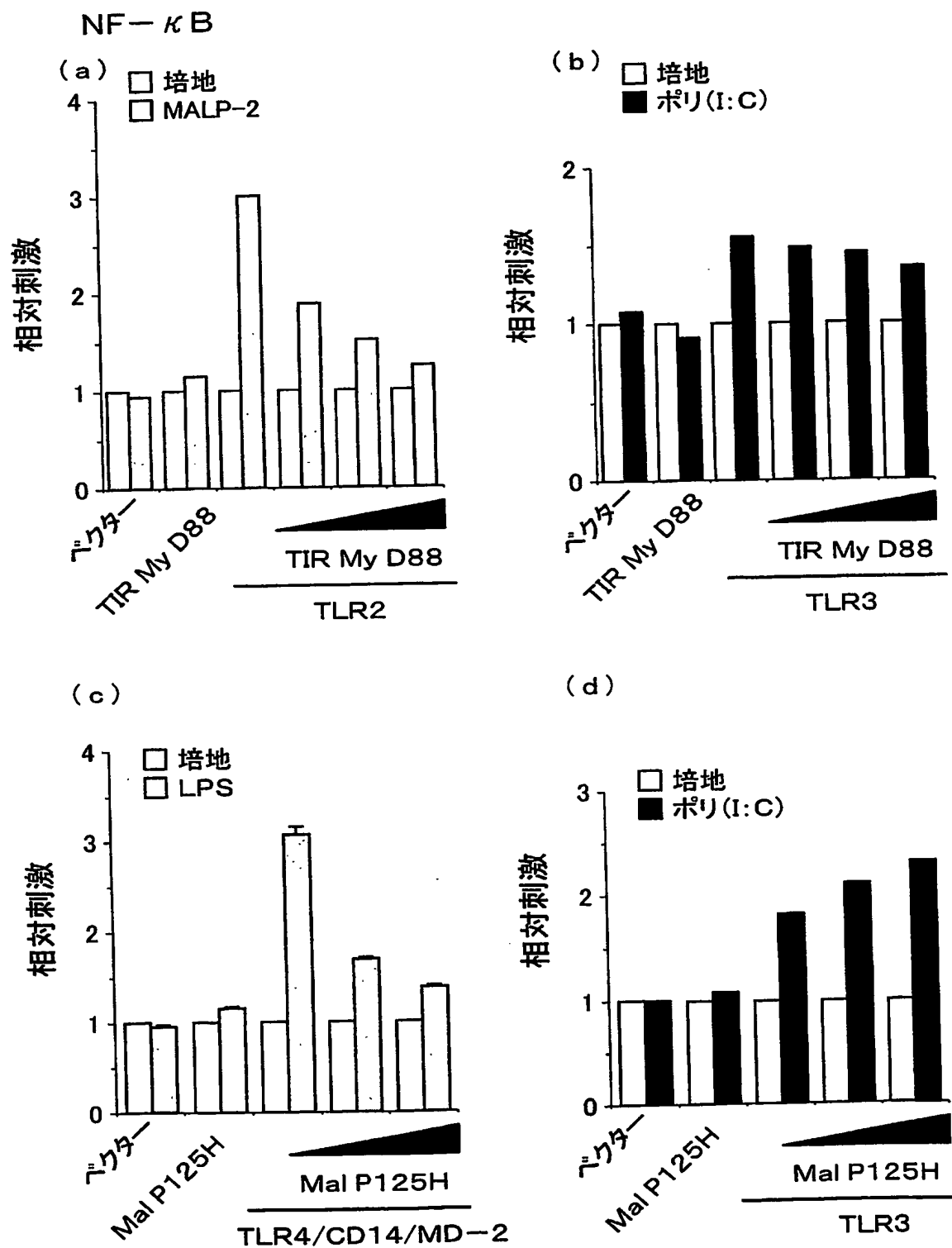
RT-PCR分析の結果を示す図である。

【図18】

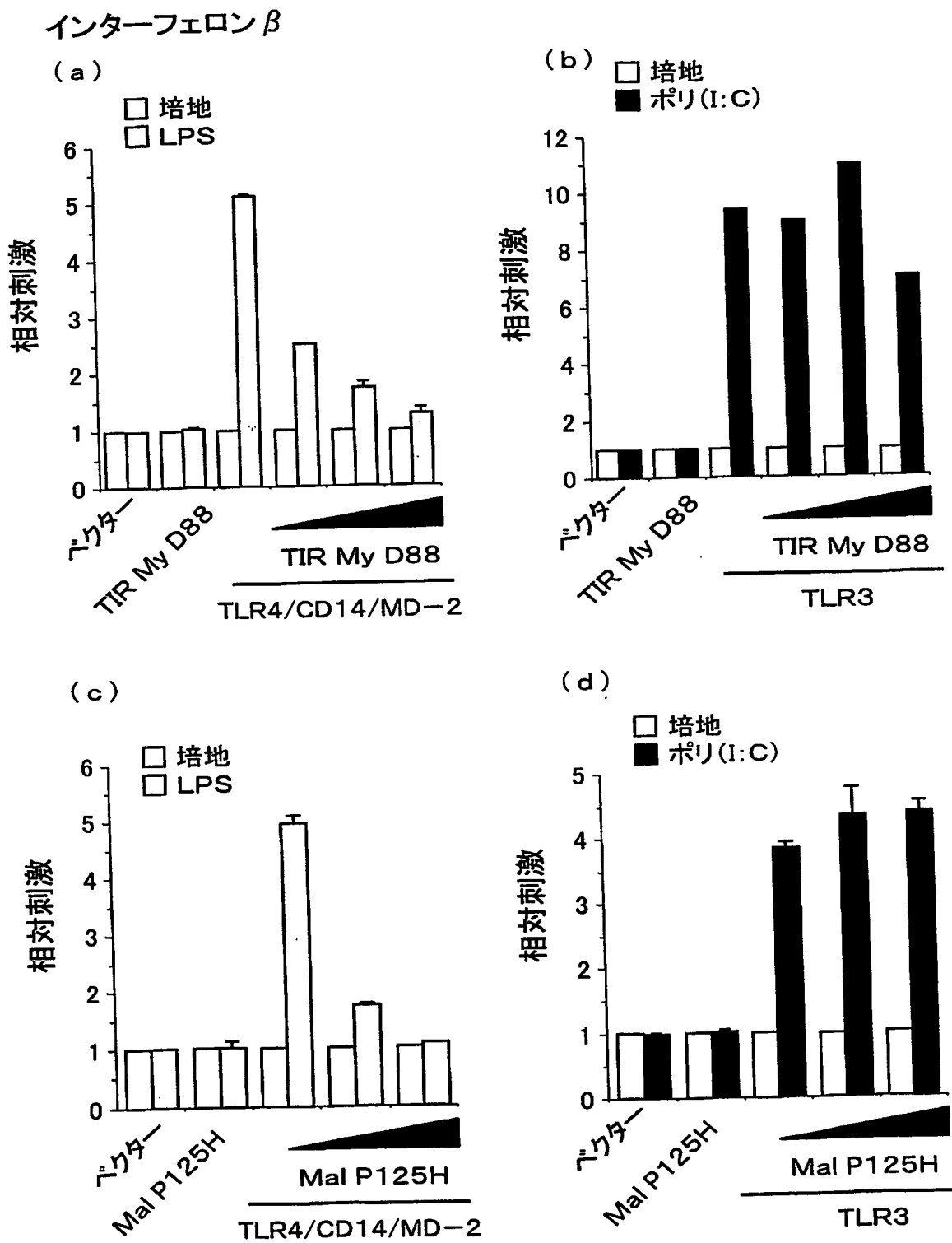
RNAiによる解析結果を示す図である。

【書類名】 図面

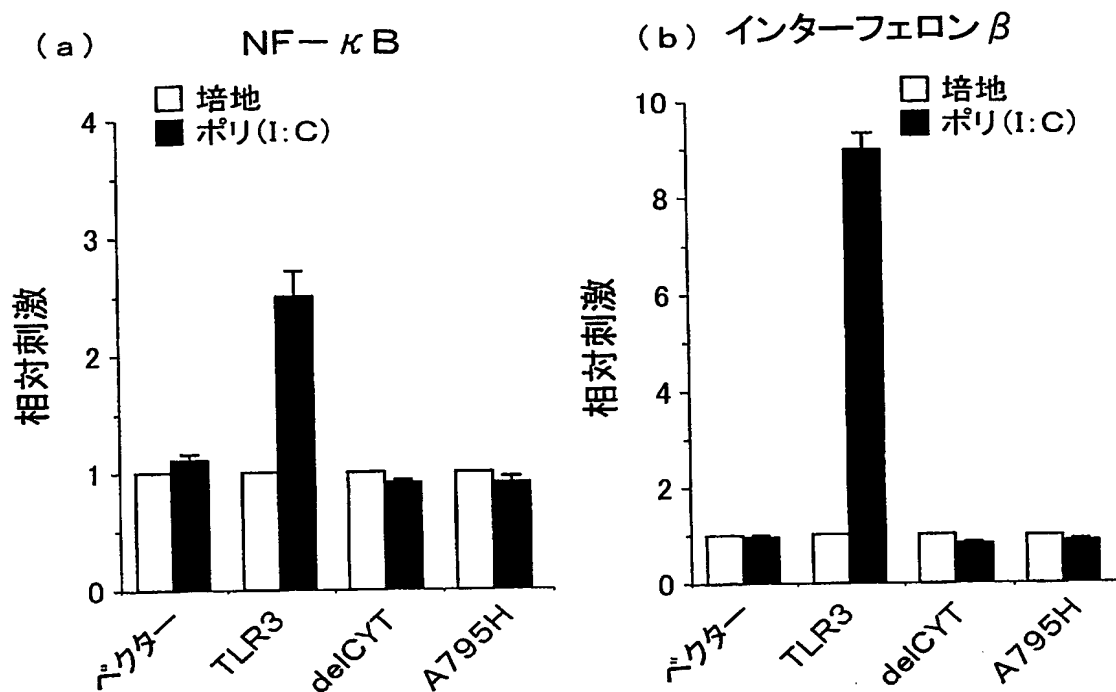
【図1】



【図2】

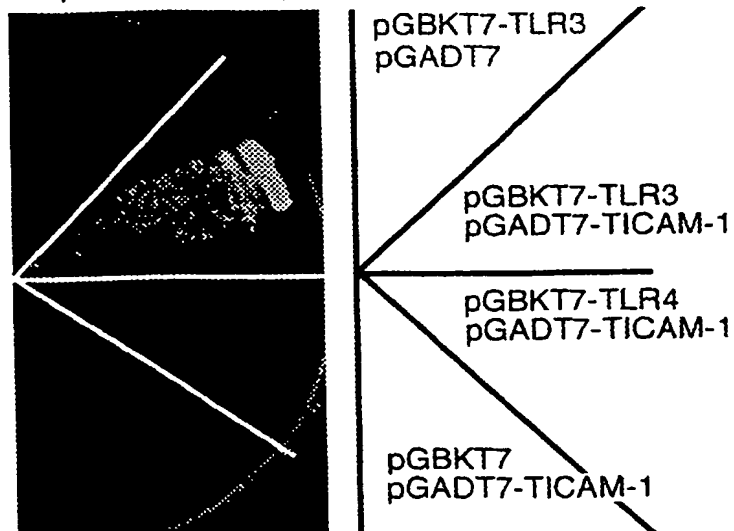


【図 3】



【図 4】

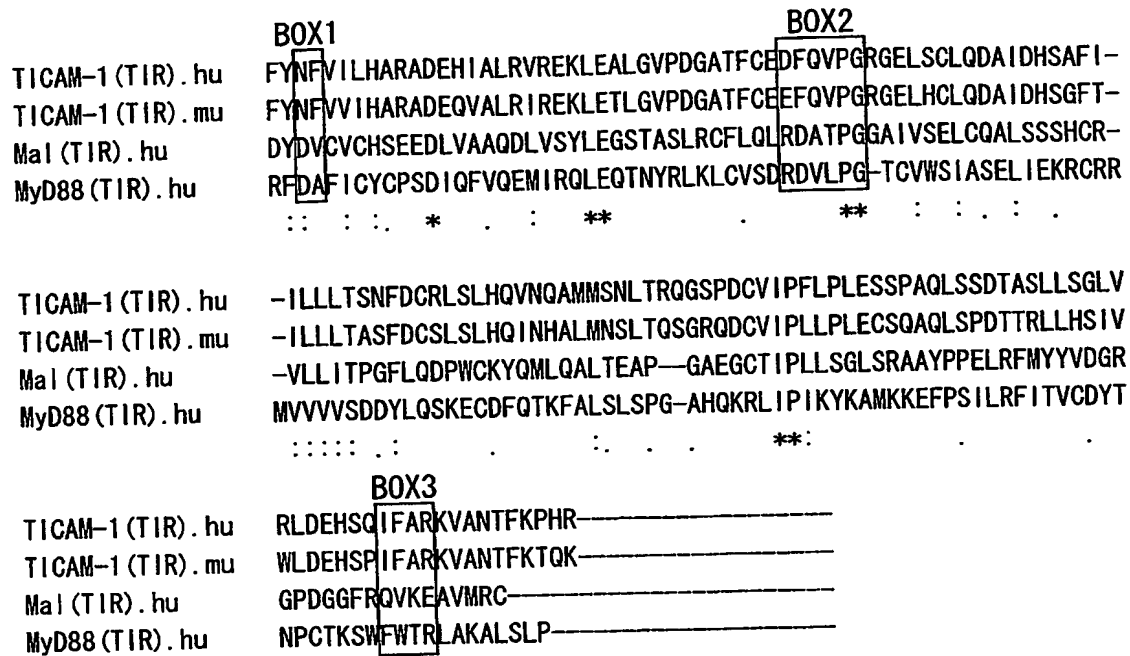
SD-Trp-Leu-His-Ade plate



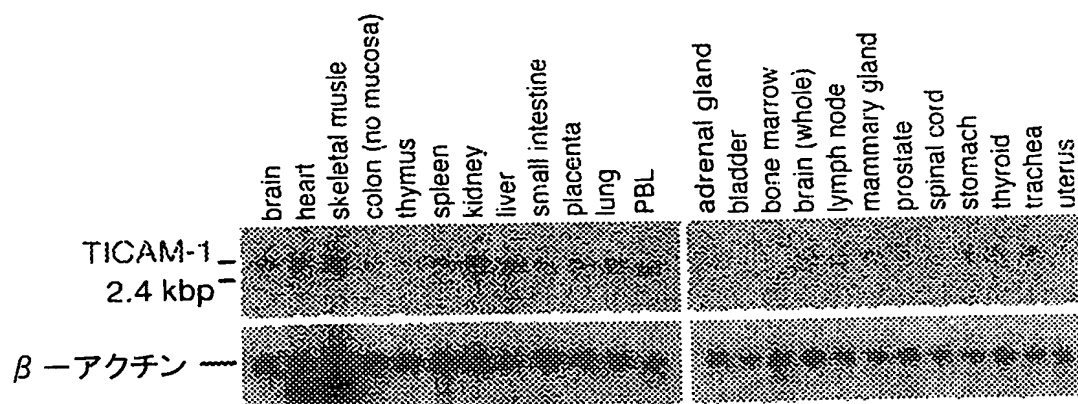
【図 5】

TICAM-1. hu TICAM-1. mu	MACTGPSLPSAFDILGAAGQDKLLYLKHKLKTPRPGCGQDILLHAMVLLKLGOETEARIS MDNPGPSLRGAFGILGALERDRLTHLKHLGSLCSGSQESKLLHAMVLLALGQDTEARVS * . **** . ** . **** : : * : **** : . * . * . **** * : **** *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	LEALKADAVARLVARQWAGVDSTEDPEEPPDVSWAVARLYHLLAEEKLCPASLRDVAYQE LESCLKMNTVAQLVAHQWADMETTEGPEEPPDLSTVARLYHLLAEENLCPASTRDMAYQV ** . ** : : ** : ** : ** . : : ** . **** * : **** * : **** * : **** *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	AVRTLSSRDDHRLGELQDEARNRCGWDIAGDPGSIRTLQSNLGCLPPSSALPSGTRSLPR ALRDFASQGDHQLGQLQNEAWDRCSSDIKGDPSGFQPLHSHQGSQPPSASPATRSQPR * : * : : . ** : ** : ** : ** : ** . ** * : : . * : * : * : * : * : * : *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	PIDGVSQSGCSLRSTGSPASLASNLEISQSPTMPFLSLHRSPHGPSKLCDDPQASLVP PID-TPDWSWGHTLHSTNSTASLASHLEISQSPTLAFLSSHGHGTHGPSKLCNTPLDTQEP *** . . **** * : : ** . * . **** : **** * : . . **** : * : *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	EPVPGGCQEPEEMSWPPSGEIASPPELPSSPPPGLPEVAPDATSTGLPDTAAPETSTNY QLVPEGCQEPEEISWPPSVETSVSLGLP—HEISVPEVSPEEASPILPDALAAPDTSVHC : ** **** : **** * : . ** . : **** : : * . **** : **** : *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	PVECTEGSAGPQSLPLPILEPVKNPCSVKDQTPQLQSVEDTTSPNTKPCPPTPTTPETSP PIECTELSTNSRSLPTSTTESVGKQWPITSQRSPQVPVGDDSLQNTTSSSPPAQPPSLQA * : **** * : . . * . . * : . . . * . * : * : . . . * . . * . . TIR
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	PPPPPP—SSTPCSAHLTPSSLFPSSLESSS—EQKFYNFVILHARADEHIALRVREK SPKLPPSPLSSASSPSSYPAPTSTSPVLHSETSDQKFYNFVILHARADEQVALRIK * * * . : ** . * . * : * * . * : : **** : **** : **** *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	LEALGVPDGATFCEDFQVPGRGELSCLODAIDHSAFIILLLTSNFDCLSLHQVNQAMMS LETGVPDGATFCEEFQVPGRGELHCLQDAIDHSGFTIILLLTASFDCSLSLHQINHALMN * : **** * : **** * : **** * : **** * : **** * : **** * : **** *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	NLTRQGSPODCVIFPLPLESSPAQLSSDTASLLSGLVRLDEHSQIFARKVANTFKPHRLQA SLTQSGRQDCVIFLLPLECSQAQLSPDTRLLHSIVWLDEHSPIFARKVANTFKTQKLQA * : * . * : **** : **** * : **** * : * : * : **** * : **** * : **** *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	RKAMWRKEQDTRALREQSHLDGERMQAAALNAAYSAYLQSYLSYQAQMEQLQVAFGSHM QVRWKKAEARTLKEQSIQLEAERQNVAAISAAYTAYVHSYRAWQAEMNKLGVAFGKNL : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	SFGTGAPYGARMPFGGQVPLGAPPPFTWPGCPQPPLHAWQAGTPPPSPQPAAFQPS— SLGTPTPSWPGCPQ—IPSHPGGTPVFPYSPQPPSFQPPCFQPPSFQPPSFPLPP * : * : * . * : * . * : * . **** : . . ** . **** : ** .
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	LPFPQSPAFPTASPAPPQSPGLQPLIIHHAQMVQLGLNNHMMWNQRGSQAPEDKTQAE— VSSPQSQSFPSASSAPQTPGPQPLIIHHAQMVQLGVNNHMMWGHTGAQSSDDKTECSEN : . ** : ** : ** . . ** : ** **** * : **** * : **** * : * : * : **** : *
TICAM-1. hu TICAM-1. mu	CMGPLTDQGEPLLETPG

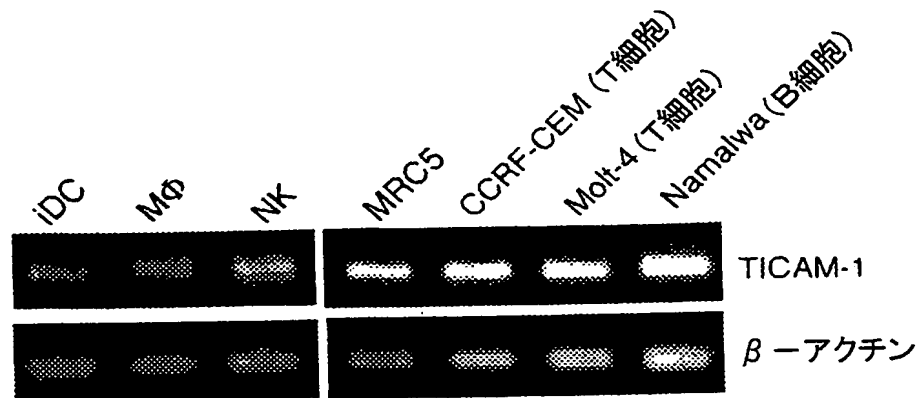
【図 6】



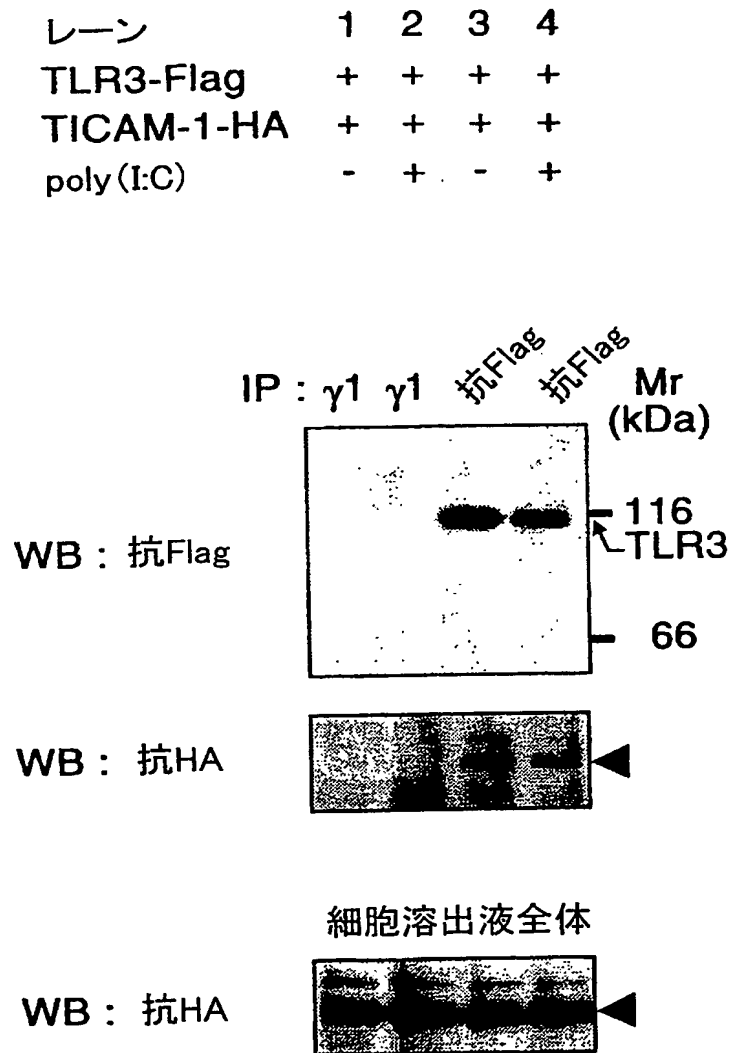
【図 7】



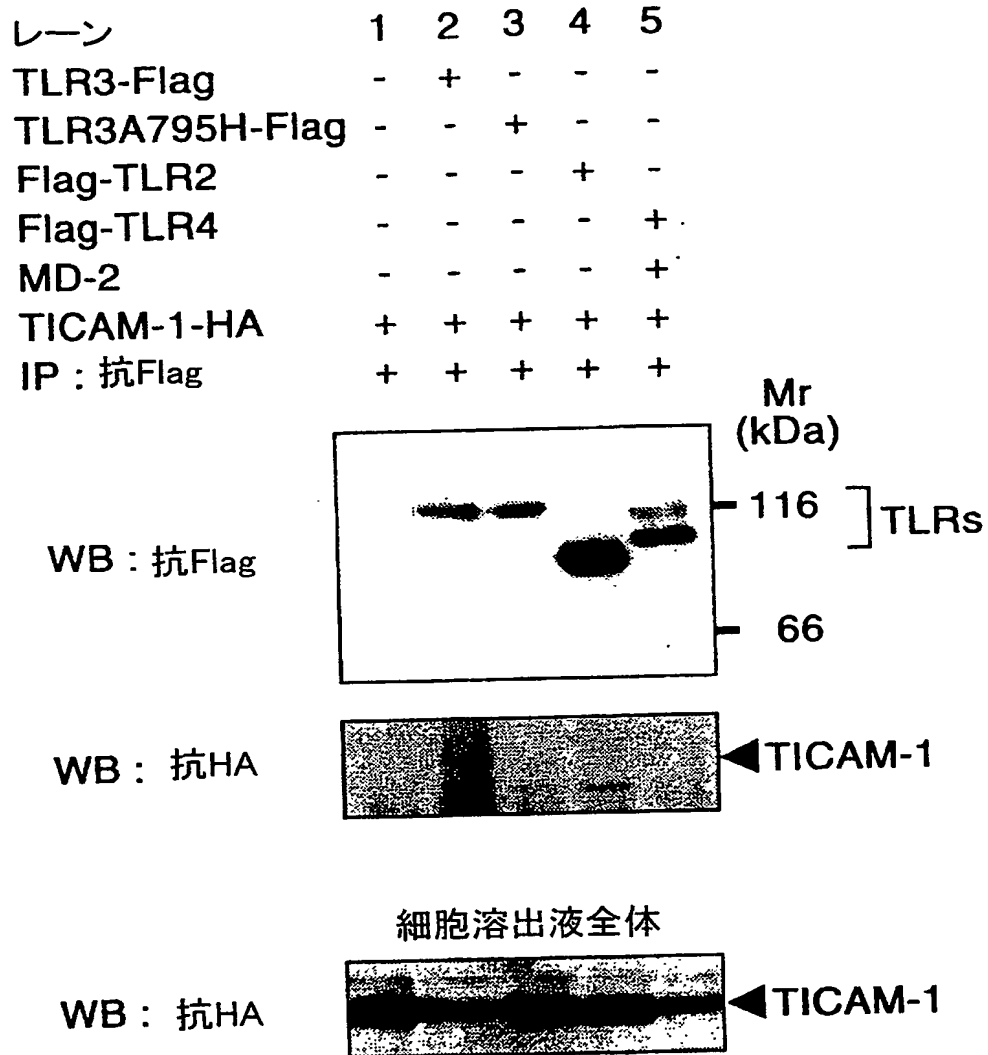
【図 8】



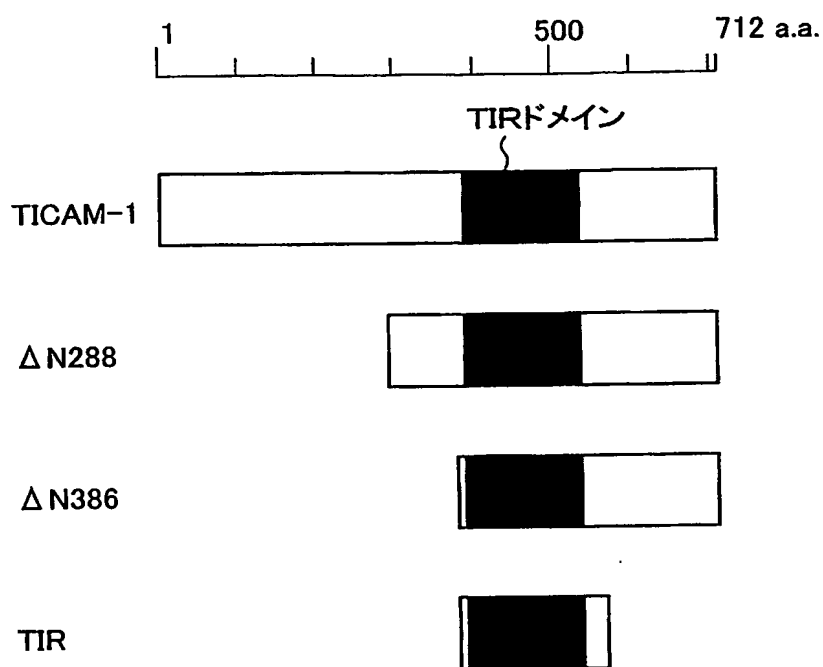
【図9】



【図10】



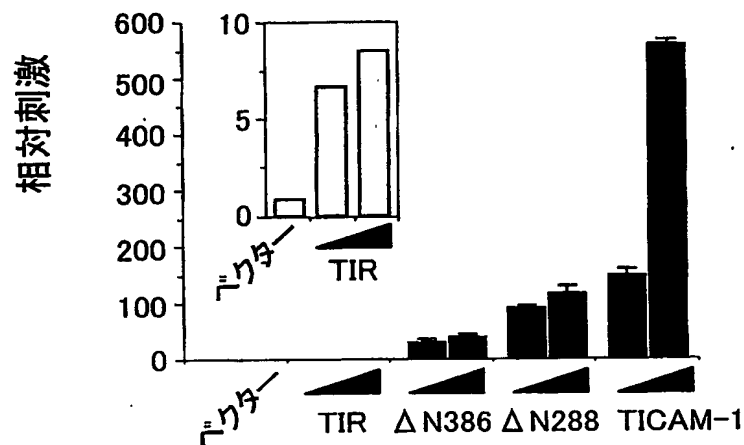
【図 11】



【図 12】

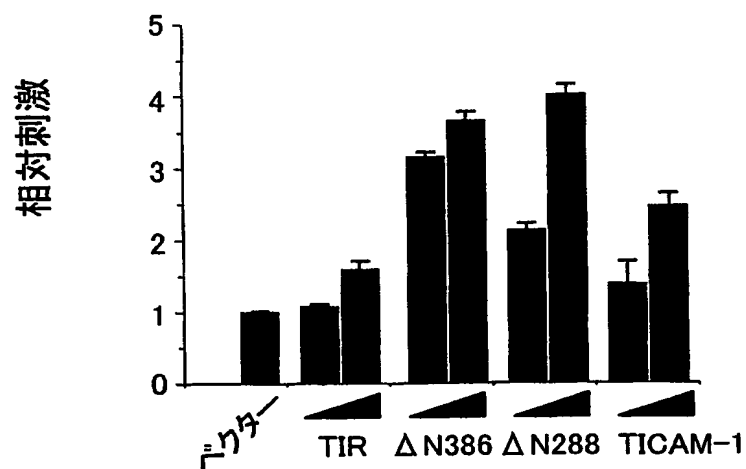
(a)

インターフェロン β



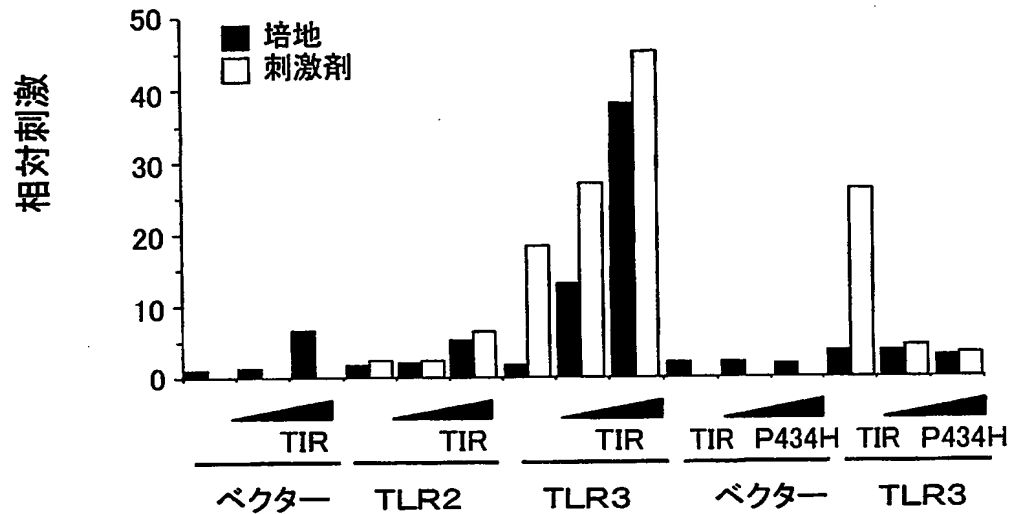
(b)

NF- κ B

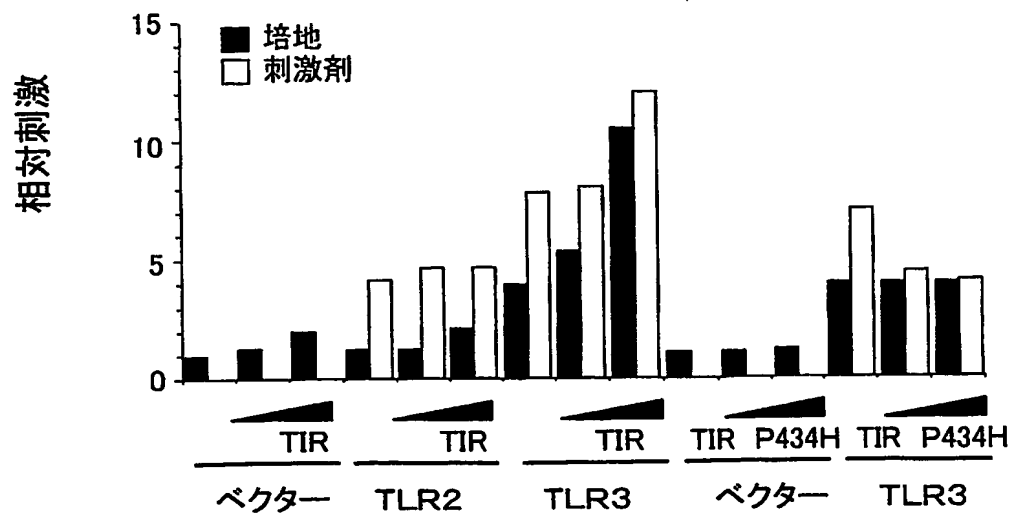


【図 13】

(a)

インターフェロン β 

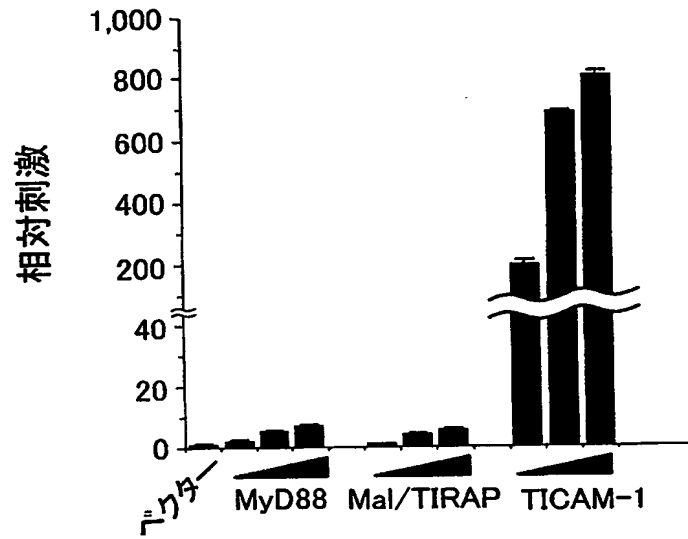
(b)

NF- κ B

【図 14】

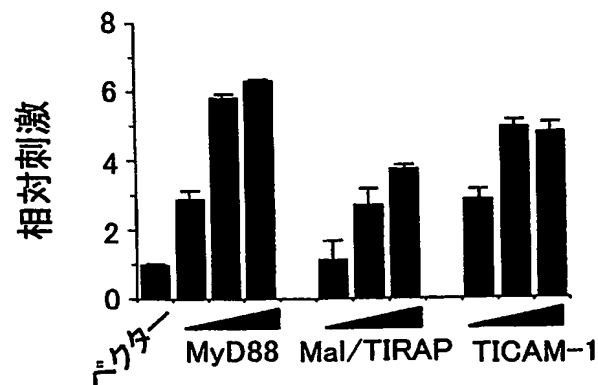
(a)

インターフェロン β

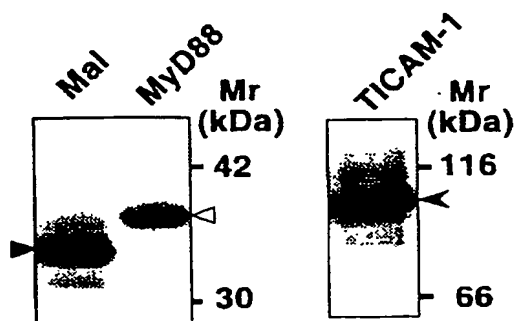


(b)

NF- κ B



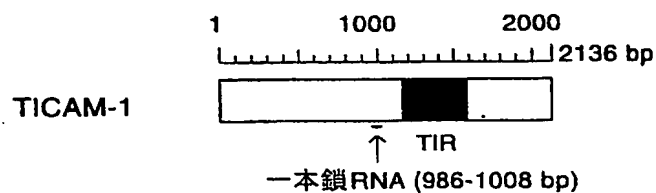
【図15】



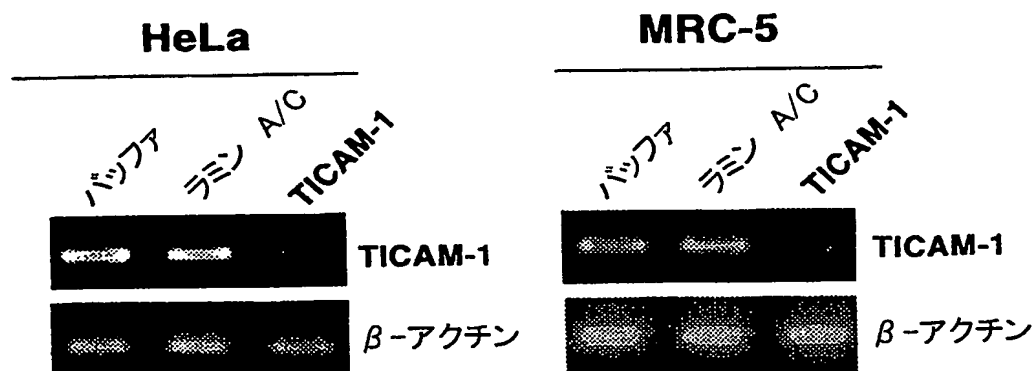
WB: 抗HA

【図16】

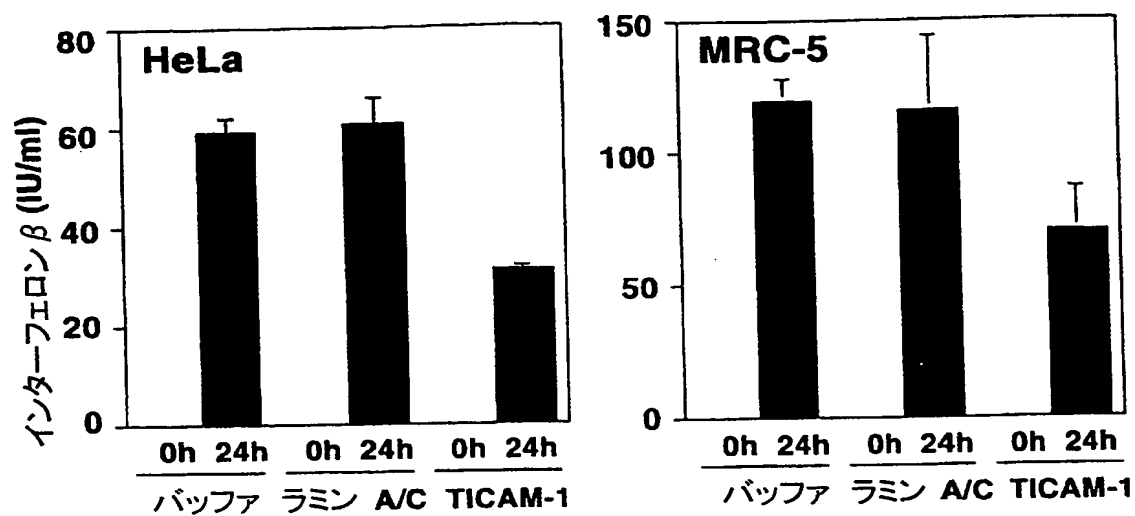
TICAM-1 センス : r(GAC CAG ACG CCA CUC CAA C)d(TT)
TICAM-1 アンチセンス : r(GUU GGA GUG GCG UCU GGU C)d(TT)



【図17】



【図 18】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 B型肝炎やC型肝炎等のウイルス感染症等の予防・治療、腫瘍の治療等に有効なI型インターフェロンの産生を制御する、哺乳動物のT o l l 様受容体3に結合する性質を持つ新規アダプタータンパク質およびその遺伝子を提供する。

【解決手段】 新規アダプタータンパク質T I C A M-1は、配列番号2または4に示されるアミノ酸配列からなり、哺乳動物のT o l l 様受容体3に対して特異的に結合する性質と、I型インターフェロンの産生を誘導する性質とを併せ持つ。上記アダプタータンパク質T I C A M-1の変異体は、T I Rドメイン（配列番号2に示されるアミノ酸配列のうち394～532番目のアミノ酸配列または配列番号4に示されるアミノ酸配列のうち396～534番目のアミノ酸配列）を有していれば、同様の性質を持つ。また、遺伝子は、アダプタータンパク質T I C A M-1をコードする遺伝子である。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2002-349015
【承継人】
【識別番号】 503360115
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
【代表者】 沖村 憲樹
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。
【物件名】 登記簿謄本 1
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2002-349015

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団

特願 2 0 0 2 - 3 4 9 0 1 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構